

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Andrea Pašková

**ÚLOHA NEUROAKTIVNÍCH STEROIDŮ V TĚHOTENSTVÍ A JEJICH VÝZNAM V
PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE**

Steroidogeneze ve III. trimestru těhotenství a mechanismus začátku porodu člověka

**THE ROLE OF NEUROACTIVE STEROIDS IN PREGNANCY AND THEIR IMPORTANCE IN PRENATAL
DIAGNOSTICS**

Steroidogenesis in the third trimester of pregnancy and mechanisms leading to the start of labor

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Pařízek Antonín, CSc.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 29. 5. 2013

MUDr. Andrea Pašková

Podpis

Identifikační záznam:

PAŠKOVÁ, Andrea. *Úloha neuroaktivních steroidů v těhotenství a jejich význam v prenatální diagnostice. [The role of neuroactive steroids in pregnancy and their importance in prenatal diagnostics]*. Praha, 2013. 100, 3. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Gynekologicko-porodnická klinika 1. LFUK a VFN, školitel Pařízek Antonín.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi svými návrhy, radami, připomínkami a odbornými materiály přispěli k vypracování disertační práce.

Zejména děkuji mému školiteli panu doc. MUDr. Antonínu Pařízkovi, CSc. za cenné rady, konzultace, trpělivost, vstřícný přístup, ochotu a snahu mi pomoci nejen při řešení mé disertační práce, ale také po celou dobu doktorského studia.

Ráda bych poděkovala panu inženýru Martinu Hillovi, DrSc. za vedení při analýze a statistickém vyhodnocení dat a MUDr. Michaele Duškové, Ph.D. za mnoho cenných rad a připomínek, ochotu a trpělivost, kterou mi věnovala. Současně děkuji celému týmu Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu za podporu a pomoc.

Upřímné poděkování patří za podporu a ochotu spolupracovníkům a vedení Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, zvláště pak panu prof. MUDr. Aloisi Martanovi, DrSc.

Velké poděkování za trpělivost a nekončící podporu patří také celé mé rodině.

Disertační práce byla podporována granty IGA 9790-4, 9834-4.

OBSAH:

I.	SEZNAM ZKRATEK	8
II.	ABSTRAKT.....	10
III.	CÍLE PROJEKTU A HYPOTÉZA.....	12
IV.	ÚVOD	13
IV.1	ROZDĚLENÍ STEROIDNÍCH HORMONŮ	14
IV.2	NEUROAKTIVNÍ STEROIDY.....	15
IV.3	BIOAKTIVNÍ ENDOGENNÍ STEROIDY A JEJICH ROLE V TĚHOTENSTVÍ, PŘI PORODU A V POPORODNÍM OBDOBÍ...	18
VI.3.1	ÚLOHA STEROIDNÍCH HORMONŮ PŘI INICIACI PORODU.....	21
IV.3.2	ANALGETICKÝ EFEKT ENDOGENNÍCH NEUROAKTIVNÍCH STEROIDŮ OKOLO PORODU	25
IV.3.3	ÚLOHA STEROIDNÍCH HORMONŮ V CNS PLODU A NOVOROZENCE	26
IV.3.4	ÚLOHA STEROIDNÍCH HORMONŮ V ROZVOJI POPORODNÍ DUŠEVNÍCH PORUCH.....	27
IV.3.5	ROLE ENDOGENNÍCH STEROIDŮ PŘI ROZVOJI TĚHOTENSKÝCH HEPATOPATIÍ	30
V.	METODY	34
V.1	PACIENTKY	34
V.2	SBĚR VZORKŮ	34
V.3	CHEMIKÁLIE A REAGENCIE	35
V.4	PŘÍSTROJE	35
V.5	PŘÍPRAVA VZORKŮ	37
V.6	TEPLOTNÍ A TLAKOVÉ GRADIENTY PRO GC-MS ANALÝZU TRIMETHYLSILYL-DERIVÁTŮ A RETENČNÍ ČASY STEROIDŮ	39
V.7	VALIDACE METODIKY	39

V.8	STATISTICKÁ ANALÝZA DAT	40
VI.	VÝSLEDKY	43
VI.1	ODHAD GESTAČNÍHO VĚKU Z HLADIN STEROIDŮ	43
VI.2	ENZYMY STERIDOGENEZY V TĚHOTENSTVÍ	49
VI.3	VÝVOJ STERIDOGENEZY V POSLEDNÍM TRIMESTRU TĚHOTENSTVÍ S OHLEDEM NA STABILITU TĚHOTENSTVÍ ...	54
VI.4	ROZDÍLY MEZI PUPEČNÍKOVOU ARTERIÍ A PUPEČNÍKOVOU VÉNOU VE VZTAHU K MOŽNOSTI NÁBĚRU SMĚSNÉ PUPEČNÍKOVÉ KRVÉ V DALŠÍ DIAGNOSTICE ZMĚN STERIDOGENEZY	60
VII.	DISKUSE.....	63
VII.1	ODHAD GESTAČNÍHO VĚKU Z HLADIN STEROIDŮ	63
VII.2	ENZYMY STERIDOGENEZY V TĚHOTENSTVÍ	68
VII.3.	VÝVOJ STERIDOGENEZY V POSLEDNÍM TRIMESTRU TĚHOTENSTVÍ S OHLEDEM NA STABILITU TĚHOTENSTVÍ ...	72
VII.3.1	POMĚRY STEROIDNÍCH HORMONŮ K AKTIVITĚ 17-HYDROXYLÁZY, C17, 20-LYÁZ A DEHYDROGENÁZ 3B- HYDROXYSTEROIDŮ (CYP17A1).....	72
VII.3.2	POMĚRY STEROIDŮ VE VZTAHU K AKTIVITĚ DEHYDROGENÁZ 3B-HYDROXYSTEROIDŮ (HSD3Bs)	72
VII.3.3	POMĚRY MEZI STEROIDNÍMI HORMONY VE VZTAHU K AKTIVITĚ AROMATÁZY (CYP19A1).....	73
VII.3.4	POMĚRY STEROIDNÍCH HORMONŮ VE VZTAHU K AKTIVITĚ 16A-HYDROXYLÁZY (CYP3A7)	73
VII.3.5	POMĚRY STEROIDNÍCH HORMONŮ VE VZTAHU K AKTIVITĚ 5A-REDUKTÁZY (SRD5A).....	75
VII.3.6	POMĚRY STEROIDNÍCH HORMONŮ VE VZTAHU K AKTIVITĚ 5B-REDUKTÁZY (AKR1D1)	75
VII.3.7	POMĚRY STEROIDNÍCH HORMONŮ VE VZTAHU K AKTIVITĚ PLURIPOTENTNÍCH IZOFOREM ENZYMŮ ZE SKUPINY 17B- HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENÁZ (HSD17B) A RODINY 1 ALDOKETOREDUKTÁZ SKUPINY C (AKR1C)	77
VII.3.8	ROVNOVÁHA MEZI KONJUGOVANÝMI A NEKONJUGOVANÝMI STEROIDY.....	78
VII.4	ROZDÍLY MEZI PUPEČNÍKOVOU ARTERIÍ A PUPEČNÍKOVOU VÉNOU VE VZTAHU K MOŽNOSTI NÁBĚRU SMĚSNÉ PUPEČNÍKOVÉ KRVÉ V DALŠÍ DIAGNOSTICE ZMĚN STERIDOGENEZY	80
VIII.	ZÁVĚR.....	81

IX.	SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE	82
X.	LITERATURA.....	83
XI.	SEZNAM VLASTNÍCH PRACÍ	98

I. SEZNAM ZKRATEK

ACTH – adrenokortikotropní hormon

AF – plodová voda

AKR1D1, AKRC1 - AKR1C4 – aldoketoreduktázy

C/U – poměr steroidních polárních konjugátů k nekonjugovaným steroidům

CNS – centrální nervový systém

CRH – kortikotropin

CYP – cytochrom P450

DHEAS – dehydroepiandrosteron sulfát

FA – fetální nadledviny

FZ – fetální zóna

GA – gestační věk

GABA – kyselina γ -aminomáselná

GABA_A-r – receptor kyseliny γ -aminomáselné typu A

HELLP syndrom – „Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count“ syndrom

HSD – hydroxysteroidní dehydrogenáza

ICP – intrahepatic cholestasis of pregnancy (intrahepatální cholestáza těhotných)

IUGR – intrauterinní retardace růstu

MV – kubitální vena matky

NMDAr – N-methyl-D-aspartátový receptor

PGF2 α – prostaglandin F2 α

PI – pregnanolonové izomery

PPB – poporodní skleslost (post partum blues)

PPMD – poporodní duševní poruchy

PPP – poporodní psychózy

PS – pregnanové steroidy

SRD – steroidní reduktáza

STS – steroidní sulfatáza

SULT – sulfotransferáza

TZ – přechodná zóna fetální nadledviny

UA – pupečnicková arterie

UGT – UDP (uridin 5'-difosfo) glukuronyltransferáza

UM – směsná umbilikální krev

UV – pupečnicková vena

II. ABSTRAKT

Steroidní hormony účinkují dvěma způsoby. Klasický účinek na genomové úrovni nastupuje relativně pomalu, v hodinách až dnech. Naopak negenomové účinky steroidů mohou ovlivnit buněčné pochody během sekund či dokonce milisekund. V průběhu těhotenství se uplatňují oba mechanismy. Steroidní hormony, které působí negenomově a ovlivňují neuronální excitabilitu, se nazývají neuroaktivní steroidy. Cílem této práce bylo stanovení hladin steroidních hormonů a zkoumání jejich vztahu k fyziologii a patofyziologii těhotenství.

Fyziologický význam zvýšení placentární tvorby progesteronu, snížení produkce 5 β -pregnanových steroidů a rostoucí aktivita steroidních sulfotransferáz s gestační věkem jsou podrobně diskutovány. Na základě námi získaných výsledků byl navržen alternativní mechanismus syntézy mateřského progesteronu v těhotenství (progesteron, resp. gestageny stabilizují činnost myometria = udržení těhotenství). Na rozdíl od dřívějších sdělení naše pozorování popisují vznik gestagenů z prekursorů ze strany plodu (z pregnenolon sulfátu).

Tento mechanismus je úzce spojen s distribucí placentárních oxidoreduktáz. Příslušná data této práce ukazují na rostoucí trend směrem k přeměně 3-oxo-(3 β -hydroxy-), 17-oxo- a 20-oxo-steroidů na jejich 3 α -hydroxy-, 17 β -hydroxy- a 20 α -hydroxy-metabolity. Z toho vyplývá, že obecným trendem v případě plodu je zvyšování produkce aktivních gestagenů, a naproti tomu snižování produkce estrogenů a aktivních GABA-ergních steroidů s přibližujícím se termínem porodu (pravděpodobně ochrana CNS plodu před oxidačním stresem). Dále také byl popsán antiestrogenní mechanismus u plodu. Tento mechanismus je založen na rostoucí aktivitě oxidačních forem 17 β -hydroxysteroidních dehydrogenáz a aldoketoreduktáz v placentě a v játrech plodu, které chrání plod před hyperestrogenizací (ochrana CNS plodu skrze modulaci iontových kanálů) vyvolanou rostoucí činností aromatázy, jejíž aktivita roste s přibližujícím se termínem porodu.

Naproti tomu u matky stoupá poměr estrogenů ke gestagenům a jejich GABA-ergním metabolitům. Tím pravděpodobně klesá stabilizující vliv gestagenů na hladké svalstvo dělohy (myometrium), což může přispívat k vyvolání kontrakcí myometria a zahájení porodu.

ABSTRACT

Steroid hormones act through two mechanisms. The first is the classical genomic level, which acts at a relatively slow pace from hours to days. The second non-genomic mechanism of steroid activity can influence cellular function during seconds or even milliseconds. During pregnancy both mechanisms take place. Steroid hormones that act non-genomically and influence neuronal excitability are called neuroactive steroids. The aim of this study was to measure the levels of steroid hormones and examine their relationship to the physiology and pathophysiology of pregnancy.

The physiological importance of increased placental progesterone production, lowered production of 5 β -pregnanone steroids and increased activity of steroid sulfotransferase with gestational age have been intensely discussed. On the basis of our results, we have proposed an alternative mechanism of maternal progesterone synthesis during pregnancy (progesterone, or the gestagen stabilizing activity of the myometrium = continuation of pregnancy). In contrast to previous results our observations indicate that gestagens arise from precursors in the fetus (from pregnenolone sulfate).

This mechanism is closely connected with the distribution of placental oxido-reductase. Data from this study show an increasing trend in the conversion of 3-oxo-(3 β -hydroxy-), 17-oxo, and 20-oxo-steroids to their 3 α -hydroxy-, 17 β -hydroxy- and 20 α -hydroxy metabolites. This indicates that there is a general trend in the fetus toward increased production of active gestagens, and in contrast a lowered production of estrogens and active GABAergic steroids as the term of birth gets closer (likely protecting the fetal CNS from oxidative stress). There has also been an anti-estrogen mechanism by the fetus described. This mechanism is based on increased activity of oxidized forms of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and aldose reductase in the placenta and fetal liver, which protect the fetus from hyper-estrogenization (guarding the fetal CNS by modulating ion channels) induced by increased aromatase activity that occurs as the term of birth gets closer.

In contrast, the ratio of estrogen to gestagens and their GABAergic metabolites increase in the mother. This likely leads to a lowered stabilizing influence of gestagens on the myometrium, which can contribute to inducing contractions of the myometrium and start of labor.

III. CÍLE PROJEKTU A HYPOTÉZA

Hypotéza: Neuroaktivní steroidy jsou významným faktorem pro udržení homeostázy fetoplacentární jednotky a pro indukci porodu.

Cílem projektu je zjistit fyziologickou roli neuroaktivních a neuroprotektivních steroidů v lidském těhotenství a odhadnout jejich význam v prenatalní diagnostice ve vztahu k riziku potratu či předčasného porodu a také v souvislosti s různými patologickými stavy. Do současné doby nebyly systematicky sledovány hladiny neuroaktivních steroidů v pupečnickovém séru během těhotenství ani vývoj proporcí mezi neuroaktivačními a neuroinhibičními steroidy. Nebyla dosud hodnocena ani souvislost mezi změnami v biosyntéze těchto látek a výskytem různých patologií v těhotenství. Nebyla rovněž hodnocena možnost změn v transportu neuroprotektivních steroidů mezi matkou a plodem během těhotenství. S ohledem na tyto chybějící informace jsme si stanovili následující konkrétní cíle:

- sledování vývoje v biosyntéze a metabolismu neuroaktivních steroidů v průběhu gestace,
- s využitím vícerozměrných regresních modelů s redukcí dimenzionality z časových profilů vývoje steroidního metabolomu v průběhu těhotenství odhadnout změny v biosyntéze a metabolismu steroidů udržujících těhotenství i jejich katabolitů a antagonistů před nástupem porodu,
- hodnocení rozdílů koncentrací neuroaktivních steroidů mezi mateřskou krví, krví z pupečnickové arterie, pupečnickové vény a plodovou vodou ve vztahu k původu steroidů a aktivitě enzymů steroidogenezy,
- analýza rozdílů mezi pupečnickovou arterií a pupečnickovou vénou ve vztahu k možnosti náběru směsné pupečnickové krve v další diagnostice změn steroidogenezy,
- interpretovat získané informace ve vztahu k iniciaci porodu a predikci termínu porodu.

IV. ÚVOD

Na začátku oplození progesteron zásadním způsobem odpovídá za přeměnu endometria v deciduu a nidaci oplodněného vejce. U člověka se však tento steroid významně podílí na celém průběhu těhotenství. Relaxací myometria udržuje délku těhotenství. Vedle progesteronu mohou být biologicky aktivní i jeho metabolity.

Metabolity progesteronu se vážou na extracelulární neurotransmiterové receptory buněčných membrán a ovlivňují jejich propustnost pro ionty. Takto působící steroidy se obecně označují jako steroidy neuroaktivní. V případě progesteronu jde o neuroaktivní steroidy pregnanového typu. Mechanismus působení neuroaktivních steroidů je negenomový a jejich účinek je proto oproti běžně genomově fungujícím steroidům velmi rychlý. Neuroaktivní steroidy jsou u těhotné ženy produkovány v řádově vyšším množství proti stavu mimo těhotenství. Na jejich produkci se v těhotenství podílí zejména nadledvina plodu a placenta, ale také játra plodu i matky. Placentární a fetální kompartmenty, které tvoří fetomaternální jednotku, jsou velice těsně propojeny, a to i z hlediska tvorby a účinku neuroaktivních steroidů. Neuroaktivní steroidy existují ve volné i konjugované formě. Volné neuroaktivní steroidy a pravděpodobně i část konjugovaných neuroaktivních steroidů procházejí placentou do mateřského oběhu. Jejich funkce v těle těhotné ženy však dosud není zcela objasněna. Očekává se, že mají podíl jednak na stabilizaci těhotenství, a na druhé straně mohou být také jedním z mediátorů začátku porodního mechanismu. Neuroaktivní steroidy se zřejmě účastní i neurohumorální stresové reakce ženy během porodu a s vysokou pravděpodobností se podílejí i na změnách poporodního duševního stavu a chování matky. V peripartálním období budou mít pravděpodobně i ochranný účinek, zejména proti hypoxii centrálního nervového systému plodu.

IV.1 Rozdělení steroidních hormonů

Steroidní hormony jsou produkty cholesterolu a jeho sulfátu. Odštěpením isokaproaldehydu (C6) z molekuly cholesterolu, kterou katalyzuje cytochrom P450 dependentní enzym odštěpující postranní řetězec vzniká pregnenolon, což platí i pro cholesterol konjugovaný. Pregnenolon a jeho sulfát jsou prekurzory všech steroidních hormonů. K přeměně pregnenolonu na steroidní hormony dochází v endoplazmatickém retikulu, v mitochondriích a v cytoplazmě buněk. Steroidní hormony nejsou ukládány v endokrinních žlázách. Jakmile jsou vytvořeny, vylučují se do oběhu. Volné steroidy jsou více či méně lipofilní a s klesající polaritou snadněji procházejí lipoproteinovými strukturami. Krevní transport molekul steroidních hormonů probíhá pomocí přenašečových proteinů (albumin, kortikosteroidy vázající globulin, pohlavní hormony vázající globulin apod.). V případě genomových účinků je pouze volná frakce steroidů biologicky aktivní. Ta však obvykle činí méně než 10,% z jejich celkového množství. Naproti tomu právě vazba na přenašečové proteiny způsobuje relativně dlouhý poločas života většiny steroidů, řádově hodiny. V rámci degradace a exkrece podléhají steroidní hormony převážně redukci a dále pak konjugaci hydroxylových skupin (na C3) se sulfátem či s glukosiduronátem. Ke konjugaci dochází zejména v játrech, ale i jinde, například v ledvinách. Konjugací významně klesá lipofilie steroidů a naopak se zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě a steroidní konjugáty se snáze vylučují. Okolo 70 % konjugovaných steroidů se vylučuje močí, 20 % stolicí a zbytek kůží.

Steroidní hormony můžeme dělit podle místa jejich účinku na steroidy s intracelulárním a extracelulárním účinkem. Intracelulárně účinné steroidy, jako malé lipofilní molekuly, snadno procházejí buněčnou membránou a vstupují do cytoplazmy, kde se vážou na intracelulární receptory, buď v cytoplazmě nebo přímo, po prostupu nukleární membránou, v jádru na DNA cílových buněk. Komplex hormon-receptor působí jako transkripční faktor, aktivuje nebo potlačuje expresi genů. V případě aktivace genů, dochází k syntéze proteinů, které vyvolávají příslušnou biologickou odpověď. Vzhledem k tomu, že intracelulárně účinné steroidy zasahují do exprese genů, nastupují jejich účinky ve srovnání s ostatními hormony pomaleji, ale zato jsou déletrvajcí. V minulosti byla již dostatečně prozkoumána steroidní regulace metabolismu, osmotické rovnováhy a sexuálních funkcí. Účinek druhé skupiny steroidních hormonů probíhá

prostřednictvím membránových receptorů. Od předchozí skupiny steroidů se tyto látky odlišují svým extracelulárním, negenomovým účinkem. Vytvářejí vazby s neurotransmiterovými receptory v buněčných stěnách, které ovlivňují propustnost iontových kanálů. Proto se tyto látky obecně označují jako neuroaktivní steroidy. Jejich účinek je velmi rychlý.

IV.2 Neuroaktivní steroidy

Začátkem 70. let minulého století našel Backström souvislost mezi premenstruální tenzí a změnami hladin estradiolu a progesteronu (Backström et al., 1975). V této době se také objevily první systematické studie sledující biosyntézu i katabolismus progesteronových metabolitů ve tkáních spojených s lidským těhotenstvím (Mitchell et al., 2005). V roce 1980 uvádí v české literatuře Schreiber, z celosvětového hlediska poprvé, termín „neurosteroid“ a o rok později je tento termín poprvé použit v zahraniční literatuře v souvislosti s experimentem podloženou hypotézou o přímé biosyntéze steroidů v mozku, a to nezávisle na periférii (Schreiber, 1980; Corpechot et al., 1981). Pozdější nález biosyntézy neuroaktivních steroidů přímo v centrálním nervovém systému (CNS) se stal důležitým mezníkem jejich výzkumu (Corpechot, 1985; Le Goascogne, 1987; Schumacher et al., 2003). Bylo prokázáno, že neurosteroidy CNS jsou syntetizovány nejen v mitochondriích neuronů, ale i v gliových buňkách (Schumacher et al., 2000). Později vychází práce, ve které Harrison a Simmonds publikují mechanismus anestetického účinku syntetického pregnanového steroidu ganaxalonu působícího prostřednictvím stimulace receptorů kyseliny γ -aminomáselné typu A ($GABA_A$ -r) (Harrison a Simmonds, 1984). V následujícím roce publikuje Majewska první práci o modulačním účinku endogenních steroidů na $GABA$ -r a zahajuje tak intenzivní výzkum v oblasti mechanismů účinku neuroaktivních steroidů, který dosud probíhá (Majewska et al., 1985).

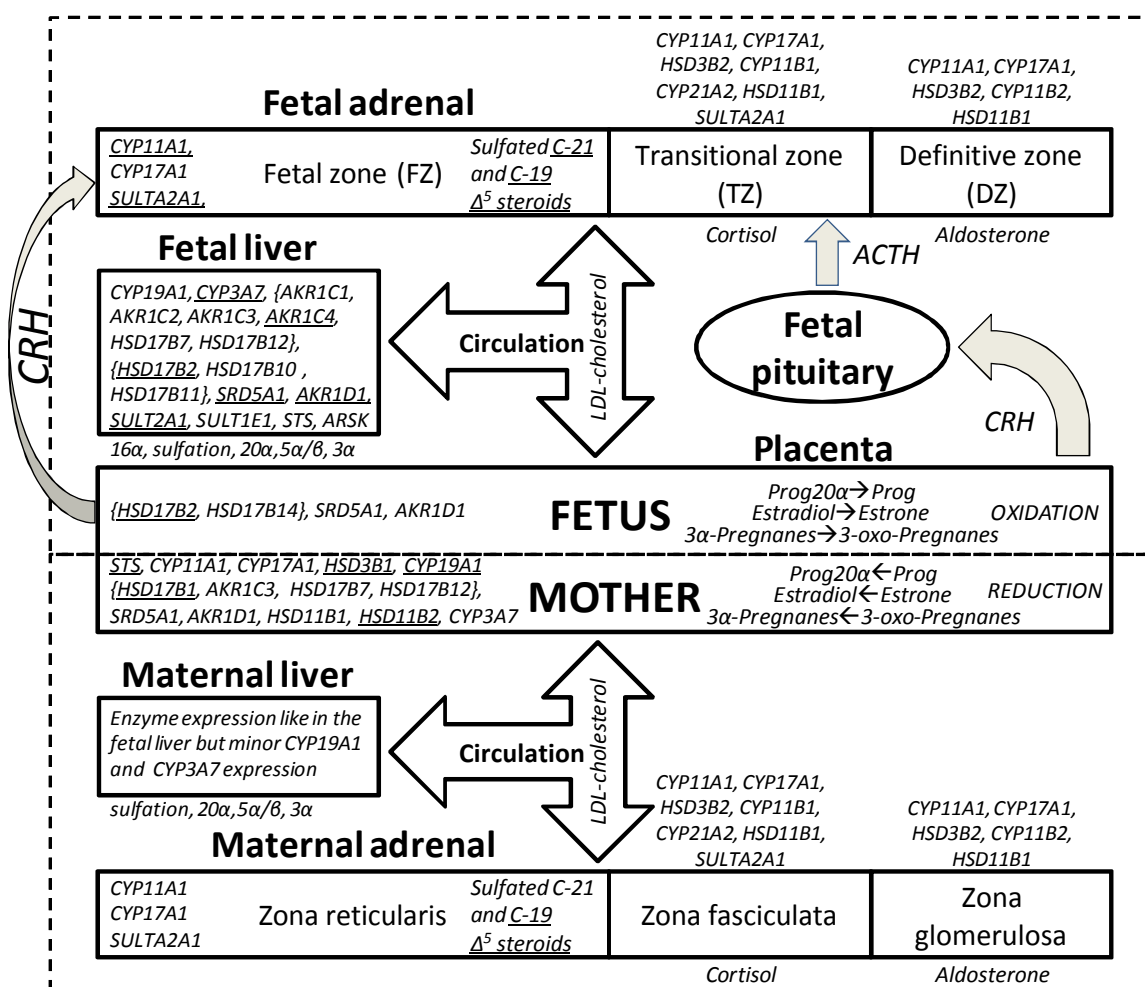
Biosyntéza neuroaktivních steroidů (Obr. 1), vykazuje velmi výrazné rozdíly v závislosti na pohlaví a věku. U netěhotných žen v reprodukčním věku je největší podíl neuroaktivních steroidů pregnanového typu (C_{21} steroidy). Zahrnují metabolity progesteronu syntetizovaného ve žlutém tělisku, zejména v luteální fázi menstruačního cyklu. Dominantním metabolitem je

allopregnanolon, tj. 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on, následují isopregnanolon, pregnanolon a epipregnanolon.

Některé nekonjugované metabolity progesteronu pozitivně modulují GABA_A-r čímž dochází k uvolnění chloridových kanálů. Výsledkem je účinek endogenně analgetický až hypnotický. Konjugované metabolity progesteronu modulují GABA_A receptory také, ale s opačným účinkem. Sulfáty redukovaných progesteronových metabolitů nasycených v poloze 5 α - působí jako pozitivní modulátory NMDA receptorů a uvolňují kalciové kanály s účinkem endogenně excitačním, zatímco odpovídající metabolity nasycené v poloze 5 β - působí antagonisticky. Na tvorbě a metabolismu neurosteroidů se podílí řada steroidogenních enzymů, jejichž změněná aktivita přinejmenším přispívá ke vzniku patologických stavů, jako jsou například premenstruační syndrom či některé formy epilepsie a depresí. Již dnes lze očekávat, že úplnější poznání tvorby a katabolismu neuroaktivních steroidů odkryje další možnosti jejich terapeutického využití k prevenci, nebo i k léčbě řady často závažných onemocnění.

IV.3 Bioaktivní endogenní steroidy a jejich role v těhotenství, při porodu a v poporodním období

Kromě diagnostiky řady patologií u plodů, novorozenců a matek, včetně předčasného porodu, řada nových poznatků ukazuje, že multikomponentní analýza steroidů v pupečnickové krvi při porodu by mohla účinně predikovat výskyt některých onemocnění během dalšího vývoje jedince. Steroidní metabolomika by mohla být zvláště významná pro predikci a diagnostiku multifaktoriálních onemocnění s polygenním genetickým pozadím. Fyziologický význam pohlavních steroidů a kortikoidů je dobře znám, zatímco fyziologická a patofyziologická relevance steroidů ovlivňujících centrální i periferní systém plodu zůstává z větší části neobjasněna.



Obr 2. Zjednodušené schéma steroidogenezy ve fetoplacentární jednotce (Hill et al., 2010 a)

Primárním orgánem steroidogenezy v těhotenství, zejména u plodu, je fetální zóna (FZ) fetální nadledviny (FA) produkující velká množství sulfatovaných Δ^5 steroidů (Obr. 2). Steroidogenní aktivita FZ je stimulována placentárním kortikotropinem (CRH). Hyperprodukce sulfatovaných Δ^5 steroidů v plodu zajišťuje prekuzory pro syntézu estrogenů a gestagenů v lidské placentě. Extrémní koncentrace progesteronu a jeho metabolitů chrání CNS plodu před oxidačním stresem a neuroexcitačními estrogeny. Přesto že CRH je klíčovým aktivátorem steroidogenezy ve FZ, jeho účinnost při predikci fetální zralosti je nízká z důvodu omezené stability tohoto proteohormonu. Naopak matematické modely navržené v rámci postgraduálního studia a založené na multikomponentní analýze steroidů při předčasných a normálních porodech a zpracování získaných dat vícerozměrnou regresí s redukcí dimenzionality pro různé tělní

tekutiny plodu a matky (UA – pupečnicková arterie, UV – pupečnicková vena, MV – kubitální vena matky a AF – plodová voda) vykazovaly nesrovnatelně lepší prediktivitu ve srovnání s CRH.

Kromě stimulace aktivity FZ, stimulují rostoucí hladiny CRH v závěru těhotenství také biosyntézu estrogenů v lidském placentárním trofoblastu. Dále, na rozdíl od dospělých jater, játra plodu extenzivně aromatizují fetální androgeny a tento proces je dále stimulován rostoucí produkcí kortikoidů s blížícím se termínem porodu.

Dalším důležitým procesem ve fetálním kompartmentu je 16α -hydroxylace steroidů katalyzovaná enzymem CYP3A7, který je specificky silně exprimován v mikrosomální frakci jater plodů a novorozenců. Téměř všechny 16α -hydroxysteroidy vykazují významně vzrůstající trend s pokračujícím těhotenstvím. 16α -hydroxylace estrogenů i jejich prekurzorů v játrech plodu je tak dalším z mechanismů chránící plod před hyperestrogenizací.

Další důležitými enzymy steroidogenezy v těhotenství jsou izoformy 5α -reduktáz (SRD5A), jejichž exprese ve fetálních játrech je čtyřnásobná proti situaci v játrech dospělých, na podstatnou roli fetálních jater při syntéze periferních a částečně i mozkových neuroaktivních steroidů. Exprese SRD5A typu 1 (SRD5A1) v lidském mozku je nejvyšší z lidských tkání, exprese tohoto enzymu v mozku fétu je přitom sedminásobná oproti situaci mimo těhotenství. Tyto výsledky tedy jasně dokumentují neuroprotektivní roli SRD5A1 proti oxidačnímu stresu při vývoji fetálního CNS, zejména pak okolo porodu.

Metabolit progesteronu 5β -dihydroprogesteron je účinné tokolytikum účinkující jednak prostřednictvím vazby na pregnanové X receptory a jednak prostřednictvím zatím blíže nespecifikovaného negenomového mechanismu. 5β -Reduktáza (AKR1D1) katalyzující vznik dihydroprogesteronu je specifický jaterní enzym, jehož aktivita v posledním trimestru klesá, jak dokazují práce vzniklé v rámci mého postgraduálního studia i práce jiných autorů (Hill et al., 2010a; Hill et al., 2010b).

Důležitým prvkem steroidogenezy rozhodujícím v konečné fázi o biologické aktivitě steroidů je reverzibilní systém steroidních pluripotentních oxidoreduktivních enzymů aktivních v polohách C-3, C-17 and C-20 steroidu. Tento systém obsahuje jednak oxido-reduktivní dehydrogenázy/reduktázy (HSD17B) a jednak čtyři aldoketoreduktázy AKR1C1 – AKR1C4.

Jednotlivé izoformy těchto enzymů preferují buď reduktivní nebo oxidativní interkonverzi steroidních hydroxylů a oxo- skupin. Tyto izoformy jsou diferenciatně exprimovány v placentě i tkáních plodu, zejména v nadledvině, játrech, ledvinách a mozku plodu.

VI.3.1 Úloha steroidních hormonů při iniciaci porodu

Na rozdíl od většiny fyziologických dějů je porod proces výrazně druhově specifický a u člověka jedinečný. Přes množství publikovaných hypotéz není mechanismus načasování porodu u člověka dosud objasněn. Pokusy na laboratorních zvířatech, snad s výjimkou velkých opic (Smith et al., 1999), mohou být jen stěží vhodnými modely pro mechanismus lidského porodu. Přitom jeho pochopení by umožňovalo lépe předcházet předčasným porodům a včas řešit i řadu dalších problémů spojených s těhotenstvím a porodem, což by vedlo k podstatným úsporám prostředků vynakládaných na řešení důsledků těchto komplikací. Objasnění jednoho z článků mechanismu iniciace porodu, a to účinku neuroaktivních steroidů, by mohlo přispět k pochopení mechanismu porodu u člověka.

Z množství publikací věnovaných lidskému porodu se jako nejpravděpodobnější varianta mechanismu jeho iniciace jeví exponenciální nárůst placentární produkce CRH, kdy jeho hladiny v mateřské cirkulaci dosahují hodnot až o čtyři řády vyšších ve srovnání se situací mimo těhotenství, přičemž vrcholu je dosaženo právě při nástupu porodu (Ellis et al., 2002; McLean a Smith 2001; Smith, 2007; Wadhwa et al., 1998; Warren et al., 1992; Wolfe et al., 1987). Na konci těhotenství je vytvářena pozitivní zpětná vazba v řadě glukokortikoidy (nadledvina), CRH (placenta), adrenokortikotropní hormon (ACTH) (hypofýza) (Emanuel et al., 1994). Placentární produkce CRH je mimo jiné inhibována estrogeny a progesteronem (Ni et al., 2004a; Ni et al., 2004b). Placentární CRH je secernován jak do mateřského, tak do fetálního kompartmentu (Goland et al., 1993; Nodwell et al., 1999), kde prostřednictvím svých receptorů v hypofýze i přímo ve fetálním kompartmentu fetální nadledviny a také prostřednictvím přímé modulace receptorů ACTH zřejmě zajišťuje jak hyperprodukcí sulfátů Δ^5 steroidů (Jaffe et al., 1998; Sirianni et al., 2005; Smith et al., 1998) ve fetální zóně fetální nadledviny, tak syntézu kortizolu v zóně

definitivní. Kortizol podporuje zrání fetálních plic a další placentární produkci CRH, zatímco v cirkulaci dobře rozpustné sulfáty Δ^5 -steroidů jsou snadno transportovány do placenty, kde jsou desulfatovány a konvertovány na progesteron (pregnenolon sulfát) či estrogenery (dehydroepiandrosteron sulfát – DHEAS) (Grammatopoulos a Hillhouse, 1999). Kromě syntézy steroidů CRH aktivuje i řadu dalších procesů vedoucích k vyvolání porodu (Smith, 2007). Porod je proto procesem multifaktoriálním.

Pokud jde o steroidy a enzymy steroidogenezy, u hlodavců a přežvýkavců je nástup porodní činnosti spojen se vzrůstem hladin estradiolu (Taylor, 1987) a s poklesem hladin progesteronu následovaným zvýšenou aktivitou 20α -hydroxysteroidní dehydrogenázy (Clementi et al., 2004). Aktivita tohoto enzymu je indukována vazbou prostaglandinu $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) na specifický receptor (Stocco et al., 2000). U člověka však je nástup porodu spojen spíše se změnami exprese izoform progesteronových a estrogenních receptorů (Mesiano, 2004) indukovanými prostaglandiny (Madsen et al., 2004). V případě estradiolu však jeho produkce exponenciálně narůstá i u člověka, a to v důsledku vzrůstající produkce jeho prekurzorů i narůstající aktivity placentární aromatázy (Leslie et al., 1994; O'Leary et al., 1991). Někteří autoři uvádějí také nárůst poměru estradiol/progesteron ve fetálních membránách (Mitchell a Wong, 1993) a v mateřském séru (Keresztes et al., 1988). Existuje dokonce studie dokumentující i u člověka pokles hladin progesteronu v mateřském séru před spontánním porodem (Neuman et al., 1992).

Je dobře známo, že progesteron hraje klíčovou roli při udržování myometriální relaxace během těhotenství (Csapo, 1956; Csapo et al., 1971). V případě lidského porodu se však dosud jen několik autorů zabývalo pravděpodobnou rolí neuroaktivních redukováných metabolitů progesteronu (Gilbert Evans et al., 2005; Hill et al., 2000; Lofgren et al., 1992; Luisi et al., 2000; Majewska et al., 1989; Parizek et al., 2005; Pearson Murphy a Allison, 2000; Sheehan et al., 2005). Tyto neuroaktivní steroidy účinkují jako endogenní modulátory propustnosti iontových kanálů u nervových buněk. Některé neuroaktivní steroidy se však mohou vázat i na receptory nukleární, zejména progesteronové (Putnam et al., 1991; Rupprecht et al., 1996). Neurosteroidy jsou aktivní v centrálním i periferním nervovém systému. Vznikají jednak přímo v mozku (Baulieu, 1998), avšak pronikají pravděpodobně (případně jejich prekurzory) do CNS i přes hematoencefalickou bariéru z periferie (Bixo et al., 1997; Bixo et al., 1995; Zhu et al., 2001), a to

včetně některých steroidních sulfátů (Asaba et al., 2000; Wang et al., 1997). Mezi jednotlivými neuroaktivními steroidy přitom existují značné rozdíly v této schopnosti dané mimo jiné i jejich polaritou (Oren et al., 2004). Ionotropní receptory jsou přítomné i mimo CNS (Carlton et al., 1999; Ong a Kerr, 1990; Ro, 2003). Z tohoto pohledu je pravděpodobné, že tyto látky mohou ovlivňovat děložní kontraktilitu i bez účasti CNS (Mahesh et al., 1996; Majewska a Vaupel, 1991; Mitchell et al., 2005; Putnam et al., 1991).

Jak již bylo uvedeno, z membránových receptorů ovlivňovaných neuroaktivními steroidy jsou nejznámější receptory kyseliny γ -aminomáselné typu A (GABA_A -r) odpovědné za influx chloridových iontů do nervových buněk a následnou inhibici nervové činnosti. Tyto receptory jsou pozitivně modulovány pregnanovými a androstanovými steroidy s hydroxylem v pozici 3α -. Maximální odezva k neuroaktivním steroidům byla pozorována u subtypu $\alpha 4\beta 3\delta$ (Adkins et al., 2001). Podjednotky α jsou ovlivňovány pregnanolonem v následující řadě: $\alpha 5 > \alpha 2 > \alpha 3 = \alpha 4 > \alpha 1$ (Smith et al., 2001). Pregnanové steroidy (PS) s hydroxylem v pozici 3β -, podobně jako polární konjugáty PS, naopak účinkují jako negativní modulátory GABA_A -r (Backstrom et al., 2005; Lundgren et al., 2003; Maitra a Reynolds, 1998). Zatímco 3α -PS jsou tedy mimořádně účinnými endogenními neuroinhibitory, 3β -PS a polární konjugáty PS působí v tomto případě neuroaktivačně (Park-Chung et al., 1999). Někteří autoři, včetně našeho týmu, přitom uvádějí až o několik řádů vyšší hladiny cirkulujících polárních konjugátů PS ve srovnání s jejich volnými analogy, a to v těhotenství (Hill et al., 2001; Hill et al., 2000; Klak et al., 2003; Mickan a Zander, 1979; Parizek et al., 2005) i mimo něj (Havlikova et al., 2006). Stanovením volných 20-oxo-PS v těhotenství se zabývaly i nečetné další práce (Luisi et al., 2000; Pearson Murphy et al., 2001). V případě těhotenských 20 α -hydroxy-PS u člověka byla z minulosti známa pouze publikace uvádějící jejich analýzu v moči (Hertz et al., 1980).

Dalším známým typem receptorů ovlivňovaným zejména polárními konjugáty PS a Δ^5 steroidů jsou N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA-r) odpovědné za influx vápenatých iontů do nervových buněk a za jejich rychlou aktivaci. Konjugáty 5 α -PS působí jako aktivátory PS, podobně jako sulfáty Δ^5 steroidů, zatímco konjugáty 5 β -PS účinkují opačně (Park-Chung et al., 1994; Weaver et al., 1997). To znamená, že konjugáty 5 α -PS jsou z tohoto pohledu neuroaktivačními substancemi, kdežto konjugáty 5 β -PS jsou neuroinhibitory.

5 β -PS blokuje kalciové kanály typu C v periferních neuronech potkanů. Uvedené iontové kanály přitom hrají významnou roli při vnímání bolesti (Todorovic et al., 2004). Pro mechanismus iniciace lidského porodu je významné, že 5 β -PS a v menší míře i 5 α -PS mohou prostřednictvím pregnanových receptorů typu X regulovat děložní kontraktilitu (Mitchell et al., 2005).

Z hlediska biochemie neuroaktivních steroidů se při ovlivnění nástupu porodu mohou uplatňovat různé metabolické kroky, z nichž nejdůležitější roli patrně hrají vratný systém steroidních oxidoreduktáz či dehydrogenáz a systém steroidních sulfatáz-sulfotransferáz. První z těchto rovnováh souvisí s aktivitami 3 α - a 3 β -hydroxysteroidních oxidoreduktáz, které by mohly ovlivňovat výsledný neuromodulační efekt pregnanových a androstanových steroidů posunem rovnováhy od neuroinhibičních 3 α -izomerů k opačně působícím 3 β -izomerům a naopak. V této souvislosti již náš tým publikoval některé poznatky (Hill et al., 2001; Hill et al., 2000; Klak et al., 2003; Parizek et al. 2005) i poznatky zcela nové (Hill et al., 2011b; Hill et al., 2010abc).

Další z rovnováh souvisí s aktivitou 20 α -hydroxysteroidní dehydrogenázy (20 α -HSD), patřící do rodiny aldo-keto reduktáz (Nishizawa et al., 2000). V literatuře zcela chyběly informace umožňující odhadnout změny konverze pregnenolonu, progesteronu, a zejména jeho redukováných derivátů na volné a konjugované 20 α -hydroxy-metabolity, a to jak během lidského těhotenství, tak okolo porodu. Je pravděpodobné, že posledně jmenovaný metabolický krok může být odpovědný za katabolismus progesteronu v závěru lidského těhotenství (Nishizawa et al., 2000), případně za redukci modulačního potenciálu u neuroinhibičních pregnanových steroidů zajišťujících podobně jako progesteron (i když odlišným mechanismem) udržení těhotenství (Brussaard a Koksma, 2003; Leng a Russell, 1999). 20 α -hydroxy- metabolity 3 α -pregnanolonových izomerů (3 α -PI) mají nižší neuromodulační aktivitu ve srovnání s mateřskými steroidy (Belelli et al., 1996). Subtyp receptoru obsahující podjednotku α 2 vykazoval nejmenší (asi šestinásobnou) redukci neuromodulační účinnosti ve srovnání se subtypy s podjednotkami α 1 a α 3. Maximální neuroinhibiční efekt pregnandiolů přitom nezávisel na subtypu α . Z hlediska polohy vodíku na uhlíku C5 nebyl nalezen rozdíl v anxiolytickém účinku mezi 5 α - a 5 β - epimerem 5 ζ -pregnan-3 α ,20 α -diolu (Carboni et al., 1996).

Progesteron, kromě řady dalších účinků, inhibuje expresi 20 α -HSD prostřednictvím glukokortikoidních receptorů (Stocco et al., 2001; Sugino et al., 1997; Veomett a Daniel, 1975). Jak bylo naznačeno výše, pokusy na zvířatech prokázaly souvislost mezi aktivitou 20 α -hydroxysteroidní dehydrogenázy (20 α -HSD) a nástupem porodu. Deficit v hladinách signálních aktivátorů transkripce (Stats), které jsou hlavními mediátory prolaktinové signální dráhy v mléčných žlázách i placentě, má za následek ukončení těhotenství již ve druhém trimestru. Uvedený deficit je přitom vysoce korelován se vzrůstem aktivity 20 α -HSD a poklesem sérového progesteronu, který u hlodavců normálně nastává teprve těsně před porodem. Naopak deficience 20 α -HSD může kompenzovat důsledky deficitu Stats (Piekorz et al., 2005). Kromě progesteronu také prolaktin inhibuje aktivitu 20 α -HSD (Lahav et al., 1977; Lamprecht et al., 1969).

Jak již bylo naznačeno výše, poslední z významnějších rovnováh, o které se uvažuje, že by mohla ovlivňovat výsledný neuromodulační efekt steroidů v těhotenství, je systém steroidních sulfatáz-sulfotransferáz. Podobně jako v případě rovnováhy mezi 3 α - a 3 β -PS i v tomto případě již byly publikovány některé poznatky v dřívějších studiích (Hill et al., 2001; Hill et al., 2000; Klak et al., 2003; Parizek et al., 2005). V případě konjugovaných pregnanolonových izomerů (PI) byly sice získány informace o stavu ve 3. trimestru (Hill et al., 2007) a okolo porodu (Hill et al., 2001), avšak dosud nejsou k dispozici data zahrnující časové profily konjugovaných PI v předchozích dvou trimestrech. Chybí také podrobnější analýza časových profilů PS po 36. týdnu těhotenství, přesto že v tomto období by měla být divergence v časových profilech porod-provokujících a porod stabilizujících steroidů pravděpodobně nejmarkantnější.

IV.3.2 Analgetický efekt endogenních neuroaktivních steroidů okolo porodu

Zvýšené hladiny neuroaktivních steroidů v mozku během těhotenství mají kauzální vztah ke změnám exprese specifických subjednotek GABA_A-r v cerebrálním kortexu a v hippocampu (Concas et al., 1999; Mostallino et al., 2009). Léčba allopregnanolonem u myši indukuje parciální

toleranci k akutním účinkům allopregnanolonu (Turkmen et al., 2006). Alterace v expresi subjednotky δGABA_A -r během těhotenství vede k region-specifickému vzestupu neuronální excitability v mozku, která je za normálních okolností navracena do původního stavu vysokými hladinami allopregnanolonu, ale za patologických podmínek může indukovat neurologické a psychiatrické poruchy spojované s těhotenstvím a postpartálním obdobím (Maguire et al., 2009). Změny v excitabilitě neuronů během těhotenství lze s největší pravděpodobností přičíst alteraci v expresi δGABA_A -r subjednotky (Maguire et al., 2009).

5 β -Dihydroprogesteron a jeho metabolity mají, kromě GABA-ergních účinků v CNS a v periférii, také analgetické účinky prostřednictvím blokace periferních kalciových kanálů kontrolujících percepci bolesti (Todorovic et al., 2004) a mohou tedy fungovat jako endogenní analgetika během porodu.

IV.3.3 Úloha steroidních hormonů v CNS plodu a novorozence

Podle některých autorů interaguje allopregnanolon s GABA_A -r a od poloviny těhotenství tak inhibuje aktivitu CNS plodu. Tato inhibice má za následek udržení nízké incidence budivé aktivity CNS, která je typická pro intrauterinní život plodu (Crossley et al., 2003). Podle jiných hraje děloha klíčovou úlohu v poskytování chemických a fyzikálních faktorů, které udržují fetus v kontinuálním spánku. Mechanismus zajišťující permanentní spánek fetu kombinuje neuroinhibiční působení spánek indukující látky adenosinu, dvou GABA_A -ergních steroidních anestetik (allopregnanolon, pregnanolon) a silného spánek indukujícího hormonu (prostaglandin D2), které působí společně s domnělým peptidovým inhibitorem a dalšími placentálními faktory (Mellor et al., 2005).

Na druhé straně, naše data (Hill et al., 2010a) ukazují 2–3krát nižší hladiny allopregnanolonu ve fetální než v maternální cirkulaci, zatímco hladiny pregnanolonu v UV přesahují tyto hladiny MV 1–2,5krát. Celkové množství GABA_A -ergních PI je tedy jen o málo vyšší než množství přítomné ve fetálním kompartmentu a to především díky příspěvku nekonjugovaného pregnanolonu. Z toho důvodu periferní GABA_A -ergní steroidy vykazují srovnatelný účinek na maternální i fetální CNS.

I když vezmeme v úvahu 1,5–3krát vyšší množství progesteronu ve fetální cirkulaci (ve srovnání s krví matky), transport progesteronu do mozku a jeho následná konverze na GABA-ergní steroidy, která vede k výslednému příspěvku GABA-ergních steroidů pocházejících z periferních zdrojů, by se mezi matkou a plodem neměla výrazně lišit. Tato data dokazují, že míra důležitosti GABAergních steroidů v udržení permanentního spánku plodu není dosud uspokojivě objasněna.

IV.3.4 Úloha steroidních hormonů v rozvoji poporodní duševních poruch

Poporodní duševní poruchy (PPMD) postihují v nějaké formě více než polovinu žen. Z větší části jde o jev přechodný, nezanechávající závažnější následky. Nicméně zůstává relativně významný podíl žen, u nichž tyto komplikace vedou k následkům jednak u nich samotných ale i u jejich dětí. Některé z těchto negativních vlivů se mohou projevit i se značným časovým odstupem například v pubertě či v dospělosti. V nejzávažnějších případech psychických poruch spojených s ukončením těhotenství může dojít i k tragickým událostem, jako je sebevražda matky či usmrcení dítěte. V každém případě jsou poporodní psychické poruchy vážným rizikem ohrožujícím zdravotní stav matky i dítěte a řešení jejich následků zatěžuje, často dlouhodobě, zdravotní i sociální systém.

PPMD lze rozdělit do třech kategorií: Poporodní skleslost (post partum blues, PPB) se vyskytuje u 50–70 % matek a většinou sama odezní v průběhu jednoho týdne bez nutnosti specifické terapie. Matky trpící PPB procházejí přechodnou fází emoční lability a smutku kolem 2. až 5. dne po porodu. Přechodná psychopatologie PPB je podobná premenstruální tenzi, jejímiž hlavním příznakem je podrážděnost. Podstatou PPB není deprese, ale náhlé a neočekávané kolísání nálady zahrnující úzkostnost, plačtivost, malodušnost, zmatenost, špatnou koncentraci a zapomnětlivost. Etiologie PPB není dosud objasněna, avšak existuje řada hypotéz (Lanczik a Brockington, 1999).

Poporodní deprese (PPD), která postihuje 10–15 % porodů, je výrazně depresivní stav vyskytující se nejčastěji mezi čtvrtým a šestým týdnem těhotenství (Godfroid a Charlot, 1996). Odhaduje

se, že téměř polovina těchto případů zůstává nezdokumentována. PPD je manifestována symptomy depresivní nálady, poruchami spánku, úzkostí, ztráty zájmu a duševní rovnováhy, pocity viny až k sebevražedným myšlenkám (Kemp et al., 2003). Poporodní psychózy (PPP) (asi 0,1–0,2 % případů) jsou nejčastěji formou bipolárních a schizoafektivních poruch. Vyžadují hospitalizaci kvůli nebezpečí sebevraždy, nebo usmrcení dítěte (Kemp et al., 2003).

Odstraněním placenty při porodu dojde kromě odstranění zdrojů téměř veškerého těhotenského CRH i placentárních steroidů, tj. estrogenů, progesteronu a jeho neuroaktivních redukováných metabolitů. Navíc dojde k odstranění zdroje prekursorů placentárních steroidů, kterým je fetální zóna fetální nadledviny. Zde produkované nejhojnější těhotenské Δ^5 steroidy, tedy pregnenolonsulfát a dehydroepiandrosteronsulfát, jsou přitom rovněž neuroaktivními steroidy.

Dlouhodobě extrémně zvýšené hladiny neuroinhibičních pregnanových steroidů v periférii patrně vedou i k jejich intenzivnějšímu průniku přes hematoencefalickou bariéru do CNS, kde indukují negativní kompenzační mechanismus, spočívající ve snížené afinitě receptorů GABA_A-r k neuroinhibičním pregnanovým steroidům.

CNS je sice schopen produkovat jisté množství vlastních neuroaktivních steroidů (Stoffel-Wagner, 2003), nicméně pokles hladin periferních steroidů by mohl vyvolat náhlý deficit neuroinhibičních steroidů působících především cestou modulace GABA_A-r. Otázkou zůstává, jak rychle se dokážou ionotropní receptory v mozku přizpůsobit podstatně sníženému přísunu steroidních modulátorů z periférie, a zdali případné poruchy v této synchronizaci nemohou souviset s manifestací PPMD, jak naznačují některé studie (Beckley a Finn, 2007). Některé studie naznačují u žen s PPD vyšší prenatální hladiny progesteronu a jejich rychlejší pokles ve srovnání s kontrolami na hladiny srovnatelné s kontrolami (Chang et al., 1995) nebo nižší (Harris et al., 1994).

Neuroinhibiční pregnanové steroidy mohou také prostřednictvím modulace GABA_A-r zprostředkovávat inhibici 5-hydroxy-tryptaminových neuronů, což může být významné pro vztah změn nálady k reprodukčními hormony podmíněným změnám jako je PPD (Kaura et al., 2007).

Zvyšují rovněž v závislosti na dávce uvolňování dopaminu v nucleus accumbens a patrně tak ovlivňují náladu a motivaci (Rouge-Pont et al., 2002).

Existuje zatím jediná studie sledující vztah pregnanových steroidů k PPMD. Allopregnanolon, progesteron, kortisol, prolaktin a estradiol byly měřeny u 40 zdravých primipar po porodu zdravých novorozenců. Ve stejný den každá z dobrovolnic odpověděla na dotazník „Hamilton Rating Scale for Depression“ pro psychometrické testy a vyplnila rovněž dotazník „Stein Questionnaire“ pro symptomy PPB (Nappi et al., 2001). 18 žen (45 %) bylo vyhodnoceno jako PPB pozitivních. Tyto ženy měly snížené hladiny allopregnanolonu, zatímco příslušná difference ve hladinách progesteronu nedosáhla statistické významnosti. U PPB negativních žen byla korelace mezi hladinami allopregnanolonu a progesteronu pozitivní, nikoliv však u žen PPB pozitivních. Mezi Hamiltonovým skóre a hladinami allopregnanolonu i progesteronu byly nalezeny významné negativní korelace (Nappi et al., 2001).

Vedle progesteronu a jeho neuroaktivních metabolitů mohou být v etiologii PPMD zapojeny i estrogeny. Estrogeny ovlivňují mentální stav paměť prostřednictvím klasických monoaminových i neurotransmiterových receptorových mechanismů v mozku, přičemž nízké hladiny estrogenů jsou spojeny s PPD. Dále estrogeny stimulují vzrůst počtu dopaminových receptorů, zvyšují hustotu 5-hydroxy-tryptaminových vazebných míst v oblastech mozku kontrolujících náladu, mentální stav, kognitivní vlastnosti, emoce a chování.

Estrogeny u hlodavců stimulují také expresi arginin-vasopresinového genu ve stria terminalis, což je oblast udržující sociální a čichovou paměť. Popsané mechanismy naznačují protektivní roli estrogenů (Fink et al., 1996), což bylo podpořeno jak jejich příznivými účinky při léčbě PPD u žen (Ahokas et al., 1999, Gregoire et al., 1996), tak negativními účinky pozorovanými po přerušení estrogení aplikace během studie u žen (Bloch et al., 2000).

Výsledky jedné studie uvádějí pokles aktivity mozkové kortikální sulfatázy a vzrůst koncentrace DHEAS v této oblasti mozku po náhlém přerušení aplikace estradiolu u krys, což by mohlo vést k utlumení aktivity GABA_A-r. Autoři studie (Maayan et al., 2005) spekulují, zda je tento poznatek relevantní ve vztahu k PPMD (Maayan et al., 2005).

Role estrogenů v rozvoji PPD vedla k myšlence jejich využití v její léčbě. Ahokas et al. zkoušeli podání estrogení substituce ženám s PDD, které byly hypogonadální. Po jednom týdnu léčby došlo u pacientek k redukci depresivní symptomatologie o polovinu (Ahokas et al., 1999). Gregoire et al. provedli placebem kontrolovanou studii, kde podávali ženám s PDD transdermálně 17 β -estradiol (200 μ g denně) a cyklicky dydrogesteron (10 mg denně 12 dní v měsíci) nebo placebo. Po měsíci léčby došlo u žen léčených estrogeny ke čtyřnásobnému snížení depresivní symptomatologie oproti skupině na placebo (Gregoire et al., 1996). Vzhledem k nedostatečným zkušenostem je však substituce estrogeny považována za doplňkovou metodu ke konvenční léčbě antidepresivy. Z výsledků dosavadních studií vyplývá, že odpověď na estrogení substituci je rychlá, s minimem nežádoucích účinků a s minimálním přestupem do mateřského mléka. Tyto výsledky ukazují na nadějnou roli estrogenů v léčbě PDD (Moses-Kolko et al., 2009).

IV.3.5 Role endogenních steroidů při rozvoji těhotenských hepatopatií

Až 3 % všech těhotenství mohou být komplikována některou jaterní chorobou. V ČR se každoročně vyskytne některá forma hepatopatie u více než 3000 těhotných. Většina patologických jaterních stavů v těhotenství je způsobena jednou z pěti jaterních nemocí typických pro těhotenství, mezi která patří: hyperemesis gravidarum, intrahepatální cholestáza těhotných (dále jen ICP – Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy), preeklampsie, HELLP syndrom a akutní steatóza jater těhotných. Od všech ostatních se významně odlišuje ICP. U této patologie však chybí jednoznačné klinické projevy a bohužel i vhodné laboratorní ukazatele.

Etiologie ICP je pravděpodobně heterogenní, s genetickou predispozicí u části pacientů (Savander et al., 2003). Prevalence ICP v České republice je 0,9 %. ICP probíhá často klinicky latentně. První známkou onemocnění bývá obvykle pruritus. Objevuje se nejčastěji mezi 25. až 32. týdnem těhotenství, v některých případech však již v prvním trimestru. ICP mívá zpravidla anikterický průběh. K hyperbilirubinémii (>100 mmol/l) dochází u 10 až 25 % pacientů většinou s odstupem 2 až 4 týdnů po manifestaci pruritu.

ICP představuje velké nebezpečí pro život plodu. Žlučové kyseliny akumulované v cirkulaci matky přechází placentární bariérou, způsobují oxidační stres (Perez et al., 2008) a mají arytmogenní účinky s rizikem srdeční zástavy plodu. U matek s ICP hrozí náhlá smrt plodu, a to často bez předchozích varovných známek (i opakovaná ultrazvuková vyšetření a kardiotokeografický monitoring mohou poskytovat fyziologické hodnoty). Žlučové kyseliny dále zvyšují střevní motilitu plodu s odchodem mekonia do plodové vody. Intrauterinní aspirace zkalené plodové vody pak ohrožuje život novorozence bezprostředně po narození. Z indikace plodu se těhotenství u ICP obvykle ukončuje předčasně (až u 60 % dětí matek s ICP). Plod pak bývá dále ohrožen také iatrogenní prematuritou.

Celosvětovým problémem je nejen monitoring míry poškození hepatocytů, ale zejména riziko ohrožení života plodu. V dnešní době je diagnostika ICP odkázána pouze na měření aktivity aminotransferáz a koncentrací žlučových kyselin. Aktivita aminotransferáz může být zvýšena až na dvacetinásobek, avšak zvyšuje se i aktivita alkalické fosfatázy a u zhruba 30 % nemocných také aktivita γ -glutamyltransferázy. Pravidlem je však výrazné zvýšení sérových koncentrací žlučových kyselin, a to někdy až na stonásobek fyziologických hodnot. Hladiny žlučových kyselin nad 40 mmol/l výrazně zvyšují nebezpečí kardiogenního selhání plodu. Vyšetření aktivity aminotransferáz však neposkytuje dostatečně specifické hodnoty a určování koncentrace žlučových kyselin je finančně náročné a nedostupné pro rutinní klinickou praxi.

Pacientky s ICP vykazují nižší produkci ACTH a kortizonu, a naopak vyšší produkci DHEAS (Zhu et al., 2010). Vezmeme-li v úvahu přímou stimulaci ACTH receptorů placentárním CRH ve fetální zóně fetální nadledviny (FZ) s přednostní produkcí DHEAS před kortizolem (Smith et al., 1998), lze v souvislosti s ICP uvažovat o porušené rovnováze mezi osami placentární CRH – (DHEAS produkující) FZ a hypofyzární osy ACTH – (kortizol produkující) přechodná zóna fetální nadledviny (TZ) v závěru gestace. CYP17A1 ve fetální nadledvině by měla u ICP fungovat spíše jako C17, 20-lyáza a méně jako C17-hydroxyláza a rovnováhy mezi C21 17-hydroxysteroidy, včetně kortikoidů a odpovídajících C19 steroidů, by měly být posunuty směrem od C21 k C19 steroidům. Tento předpokládaný posun by mohl být úspěšně využit k odhadu intenzity ICP a predikci nejvhodnějšího termínu ukončení těhotenství z hlediska kondice plodu.

Modelu simulujícím ICP u potkanů naznačuje sníženou aktivitu CYP7B1 vlivem ICP (Leuenberger et al., 2009). CYP7B1 přitom katabolizuje prekurzory estrogenů a tak snižuje riziko vzniku ICP. Naše již vyvinutá metodika zahrnuje stanovení 7 α /oxo/beta-metabolitů C19-steroidů, které by tak mohly být rovněž účinnými prediktory ICP.

Někteří autoři (Sentilhes et al., 2006) navrhují u pacientek s ICP ukončit těhotenství při dosažení plicní zralosti plodu, která úzce souvisí se zahájením produkce kortikoidů v TZ. Proto by jak kortikoidy, tak i některé z jejich prekurzorů (17-hydroxy-C21-steroidy) a 5 α / β -redukovaných metabolitů mohly být účinnými prediktory ICP.

Vzhledem ke dříve naznačené aktivitě sterolových/steroidních sulfotransferáz (Reyes, 2000), do modelu zahrneme jak volné steroidy, tak i jejich polární konjugáty.

ICP pravděpodobně poškozuje buněčné organely (Ding et al., 2005; Macias et al., 2000), což se může projevit změnami fyziologických funkcí syncytiálních buněk, a tedy i metabolismu a transportu žlučových kyselin a steroidů v placentě. Vezmeme-li v úvahu nedávno publikovanou souvislost (Hill et al., 2010a,c) mezi distribucí oxidativně či reduktivně působících izoform placentárních oxidoreduktáz a zcela rozdílnými poměry mezi steroidy s hydroxy- a oxo-skupinami ve steroidních pozicích C3, C17 a C20 ve venózní pupečnickové krvi (převažují ketony) a v mateřské cirkulaci (převažují hydroxyly) a přitom zásadním vlivem těchto skupin na bioaktivitu těhotenství udržujících steroidů (progesteron a jeho redukované metabolity) a porod-provokujícího estradiolu, lze očekávat vliv ICP na trvání těhotenství. Vzhledem k vyšším koncentracím žlučových kyselin u matky (Laatikainen et al., 1978) lze očekávat vyšší poškození placentárních zón v blízkosti mateřského kompartmentu, tedy v syncytiu. Syncytium exprimuje enzymy konvertující ketony na hydroxyly, tzn. i neaktivní estron na aktivní, porod provokující estradiol (Hill et al., 2010a). Proto zřejmě ani plody značně poškozené ICP nemají tendenci k předčasnému porodu, a to i přes aktivaci oxytocinových receptorů v myometriu zvýšenou produkcí žlučových kyselin (Germain et al., 2003). Výše popsaná hypotéza je podpořena i výsledky dřívější studie uvádějící negativní efekt ICP na aktivitu několika placentárních cytochrom P450-dependentních (CYP) monooxygenáz (Pasanen et al., 1997). Jedna ze současných studií (Zhu et al., 2010) uvádí zvýšenou tendenci k úzkostným stavům u matky s ICP v prepartálním období, což by mohlo rovněž souviset s poškozením syncytia exprimujícího

reduktivně působící izoformy oxidoreduktáz. Podobně jako v případě již publikovaného snížení hladin estradiolu, mělo by na základě naší hypotézy dojít i ke snížení hladin GABA-ergních 3 α -hydroxy-5 α / β -steroidů. V těhotenství tyto látky dosahují fyziologicky významných hladin, jimž se minimálně dvěma mechanismy přizpůsobuje i citlivost GABA(A)-receptorů (Koksma et al., 2003; Biggio et al., 2009). Uvedené steroidy, vzhledem k nízké polaritě, poměrně snadno pronikají hematoencefalickou bariérou a působí na GABA_A-r v mozku. Proto by mohla existovat souvislost mezi snížením periferní produkce GABA-ergních steroidů a zvýšeným výskytem úzkostných stavů u pacientek s ICP.

Vzhledem k negativnímu ovlivnění transplacentárního transportu žlučových kyselin ICP (Macias et al., 2000; Ding et al., 2005) je možný analogický efekt i u steroidů.

Leslie et al. (Leslie et al., 2000) uvádějí významně nižší hladiny estrogenů a DHEAS (klíčový prekurzor pro placentární syntézu estrogenů) u žen s ICP. Autoři naznačují poškození syntézy DHEAS ve FZ a dále i jeho následné konverze na estrogeny v placentě. Měřili však jen steroidy v séru matky. Otázkou tedy je, zdali tento efekt není způsoben spíše poškozením placentárního transportu steroidů a žlučových kyselin (Macias et al., 2000; Ding et al., 2005).

V. METODY

V.1 Pacientky

Sledovaná skupina představovala 50 žen (ve věku 21–41 let), u kterých proběhl porod mezi 28. až 41. týdnem těhotenství. Dvanáct (24 %) žen, které porodily po 38. týdnu gestace, nemělo žádné perinatologické komplikace. Z 38 porodů (76 %), které proběhly mezi 28. a 37. týdnem gestace, bylo 29 (76,3 %) ukončeno císařským řezem z důvodů zdravotních rizik pro matku nebo plod a 9 porodů (23,7 %) proběhlo vaginálně se spontánní děložní aktivitou.

Důvodem předčasné děložní aktivity byla u těchto žen infekce matky, dokumentovaná vysokými hladinami CRP, leukocytózou a horečkou. Na rozdíl od skupiny zdravých žen, které porodily po 38. týdnu gestace, byly všechny předčasné porody se spontánní děložní aktivitou indukované náhlými neočekávanými komplikacemi, kde byla ve vztahu k nim nižší pravděpodobnost postupných změn ve steroidním metabolomu.

Závislost předčasných porodů vedených císařským řezem na stavu metabolismu steroidů je ještě méně pravděpodobná. Ačkoli nemáme k dispozici žádné nástroje pro ověření našeho předpokladu, že důvody pro předčasné porody se spontánní aktivitou dělohy nesouvisely se steroidogenezou, snažili jsme se vybrat ženy, u kterých byla maximální pravděpodobnost shody steroidního metabolomu s aktuálním gestačním věkem (GA), a to jak v případě předčasných porodů, tak i u porodů v termínu. Studie byla schválena lokální Etickou komisí VFN a ženy podstoupily sběr vzorků po podepsání informovaného souhlasu.

V.2 Sběr vzorků

Bezprostředně po oddělení pupečníku od novorozence byly odebrány vzorky arteriální a venózní pupečnickové krve a vzorky krve matky z kubitální vény. Ve druhé době porodní byl odebrán vzorek plodové vody. Druhá doba porodní se rozumí doba mezi úplnou dilatací děložního hrdla a kompletním průchodem dítěte porodním kanálem. Plodová voda byla v naší studii odebrána

po porození hlavičky dítěte. Každý vzorek byl odebrán do předchlazené plastové zkumavky obsahující 100 µl 5% EDTA. Krevní plazma byla získána po centrifugaci trvající 5 minut pro 2000 g při 4 °C. Vzorky plazmy a plodové vody byly do doby vlastní analýzy uchovávány při –20°C.

V.3 Chemikálie a reagenty

Steroidy byly zakoupeny od firmy Steraloids (Newport, RI, USA), Sylon B od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA), methoxylamin-hydrochlorid od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA) a rozpouštědla od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

V.4 Přístroje

K měření koncentrací steroidů pro derivatizaci byl použit systém GCMS-QP2010 Plus od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko) skládající se z plynového chromatografu vybaveného automatickou kontrolou průtoku, autosamplerem AOC-20s a samostatným kvadrupólovým detektorem (single quadrupole detector) a iontovým zdrojem s volitelným napětím v rozmezí 10–195 V. K analýze byla použita středně polární kapilární kolona RESTEK Rxi (průměr 0,25 mm, délka 15 m, tloušťka filmu 0,1 µm).

Měření probíhalo na základě ionizace dopadem elektronů s napětím iontového zdroje nastaveným na 70 V a s emisním proudem 160 µA. Teplota injekčního portu, zdroj iontů a rozhraní bylo udržováno na teplotě 220 °C, 300 °C a 310 °C v daném pořadí. Analýzy byly provedeny v módu selected ion monitoring s konstantní lineární rychlostí transportního plynu (He), udržovanou na 60 cm/s.

Průtok oplachu septa byl nastaven na 3 ml/min. Vzorky byly vstřikovány pomocí vysokotlakého módu, kdy byl tlak při vstřiku a po něm byl udržován po dobu 1 minuty na úrovni 200 kPa. Napětí detektoru (elektronásobiče) bylo nastaveno na úrovni 1,4 kV.

V mateřských a fetálních tělních tekutinách byly pomocí metody GC-MS měřeny hladiny 40 nekonjugovaných steroidů a 29 polárních konjugátů steroidů.

Kvantifikovali jsme následující steroidy:

- **Δ^5 steroidy** – pregnenolon, 17-hydroxypregnenolon, dehydroepiandrosteron (DHEA) a androstendiol včetně odpovídajících polárních konjugátů,
- **Δ^4 steroidy** – progesteron, 17-hydroxyprogesteron, androstendion, testosteron,
- **estrogeny** – estron, estradiol, estriol, 16 α -hydroxyestron, včetně odpovídajících polárních konjugátů kromě konjugovaného 16 α -hydroxyestronu, 5 α / β -redukováných-20-oxo-metabolitů progesteronu tj. 5 α -dihydroprogesteronu, allopregnanolonu, isopregnanolonu, 5 β -dihydroprogesteronu, pregnanolonu, epipregnanolonu,
- **20 α -hydroxy-metabolity** Prog a Preg – 2 0 α -dihydropregnenolon a 20 α -dihydroprogesteron, včetně odpovídajících polárních konjugátů,
- **5 α / β -reduované-20 α -hydroxy-metabolity progesteronu** – 5 α ,20 α -tetrahydroprogesteron, 5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol, 5 α -pregnan-3 β ,20 α -diol, P5 β 20 α -tetrahydroprogesteron, 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol, 5 β -pregnan-3 β ,20 α -diol, včetně odpovídajících polárních konjugátů
- **C19 5 α / β -reduované-17-oxo-steroidy** – androsteron, etiocholanolon a také jejich odpovídající polární konjugáty a polární konjugáty epiandrosteronu,
- **polární konjugáty C19 5 α / β -reduvaných-17 β -hydroxy-steroidů** – 5 α -androstan-3 α ,17 β -diolu, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diolu, 5 β -androstan-3 α ,17 β -diolu a 5 β -androstan-3 β ,17 β -diolu,
- **7 α / β -hydroxy-metabolity Preg, DHEA a androstendiolu** – 7 α -hydroxy-pregnenolon a 7 β -hydroxy-pregnenolon, 7 α -hydroxy-DHEA, 7 β -hydroxy-DHEA, 5-androsten-3 β ,7 α ,17 β -triol, 5-androsten-3 β ,7 β ,17 β -triol, stejně jako jejich odpovídající polární konjugáty,
- **16 α -hydroxy-metabolity Δ^5 steroidů** – 16 α -hydroxypregnenolon, 16 α -hydroxy-DHEA a také jejich odpovídající polární konjugáty,
- **16 α -hydroxy-metabolity Δ^4 steroidů** – 16 α -hydroxyprogesteron, 16 α -hydroxy-androstendion a 16 α -hydroxytestosteron.

V.5 Příprava vzorků

Nekonjugované steroidy byly extrahovány z 1 ml krevní plazmy a plodové vody pomocí diethyléterem (3 ml). Diethyléterový extrakt byl odpařen v termobloku při 37 °C. Lipidy v odparku po diethyléterové extrakci byly odděleny extrakcí mezi směsí metanolu a vody v poměru 4 : 1 (1 ml) a pentanu (1 ml), přičemž pentanová fáze obsahující lipidy byla zlikvidována a polární fáze se steroidy byla odpařena ve vakuové centrifuze při 60°C (po dobu 2 hodin).

Odparek polární fáze bylo derivatizován nejprve roztokem methoxylamin-hydrochloridu v pyridinu (2 %), kdy byly obsazeny oxo-skupiny (inkubace při 60 °C, 1 hodina). Směs vzniklá po první derivatizaci byla odpařena v proudu dusíku a vzniklý odparek byl dále derivatizován pomocí reagentie Sylon B (99% bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid a 1% trimethylchlorosilan) za vzniku trimethylsilyl-derivátů na hydroxy-skupinách steroidů (TMS-MOX deriváty), (inkubace při 90 °C, 1 hodina). Směs vzniklá při druhé derivatizaci byla odpařena v proudu dusíku a odparek byl rozpuštěn ve 20 µl izooktanu přičemž pro GC-MS analýzu byl použit 1 µl roztoku.

Steroidní konjugáty, které zůstaly v rafinátech (vodných fázích) po extrakci diethyléterem, byly analyzovány následovně: Rafináty byly odpařeny ve vakuové centrifuze (při 37 °C po dobu 5 hodin) a odparky byly hydrolyzovány podle Dehennina (Dehennin et al., 1996). Hydrolyzované vzorky byly znovu odpařeny ve vakuové centrifuze (při 37 °C po dobu 5 hodin).

Odparky pak byly rekonstituovány v 1 ml chromatografické vody a následně analyzovány stejným postupem jako v případě volných steroidů. Na rozdíl od přípravy vzorku volného steroidu byl však odparek po druhé derivatizaci rozpuštěn ve 200 µl izooktanu namísto 20 µl izooktanu. Před dalším zpracováním byly k původním vzorkům i vodným fázím po hydrolýze a extrakci diethyléterem přidány 17α-estradiol jako vnitřní standard.

Odezva vnitřního standardu byla zaznamenávána na efektivních hmotnostech $m/z = 231$, 285 a 416. Přidání vnitřního standardu k tělní tekutině před přípravou vzorku (volné steroidy) a k polární fázi po extrakci diethyléterem (konjugované steroidy) zohlednilo vliv ztrát vznikajících během zpracování vzorku a ty pak neovlivňovaly vlastní kvantifikaci steroidů. Nicméně zkoumali

jsme rovněž extrakční účinnost diethyléterové extrakce, stejně jako účinnost rozdělení odparku po diethyléterové extrakci mezi směs metanolu a vody a pentanu.

V prvním případě se extrakční účinnost pohybovala mezi 75,6 % a 96,2 %, s lepšími parametry pro méně polarizované steroidy. Pro rozdělení odparku po diethyléterové extrakci mezi směs metanolu a vody a pentanu byla extrakční účinnost nejnížší pro málo polární izomery pregnanolonu, jako je pregnanolon (76,3 %), a naopak dosahovala téměř 100 % v případě steroidů s vyšší polaritou než u progesteronu, u kterého byla účinnost extrakce 99,6 %.

Ačkoli je přidání odpovídajícího steroidního konjugátu jako vnitřního standardu k původnímu vzorku správnější než přidání nekonjugovaného standardu do vodné fáze po extrakci volných steroidů diethyléterem, nenašli jsme žádný odpovídající a komerčně dostupný steroidní konjugát, který by dosahoval zanedbatelných hladin v lidském krevním oběhu.

Nicméně účinnost hydrolýzy v několika komerčně dostupných steroidních konjugátech byla ověřena porovnáním známých množství nekonjugovaných steroidů (1 ng) po extrakci diethyléterem s ekvimolárním množstvím příslušných sulfátů po hydrolýze a extrakci volných steroidů diethyléterem. Testovali jsme účinnost hydrolýzy v 10 paralelních měřeních a naměřili jsme hodnoty $98,4 \pm 1,8$ %, $89,8 \pm 1,3$ %, $82 \pm 1,5$ %, $93,7 \pm 1,7$ %, $91,8 \pm 1,9$ %, $77,4 \pm 1,5$ %, $79,6 \pm 2,3$ %, $92,5 \pm 2,8$ %, $84 \pm 2,2$ %, $66,8 \pm 2$ % a $72,4 \pm 2$ % (průměr \pm SEM) pro sulfáty androsteronu, etiocholanolonu, epiandrosteronu, 17-hydroxypregnenolonu, dehydroepiandrosteronu, estronu, pregnenolonu, epipregnanolonu, allopregnanolonu, pregnanolonu a isopregnanolonu, v uvedeném pořadí.

Tyto hodnoty ukazují, že odhady pro steroidní konjugáty s použitím hydrolýzy navržené Dehenninem et al. ve většině případů dobře odrážejí aktuální hladiny konjugovaných steroidů v krevním oběhu. I když by bylo vhodné použít získané hodnoty ke korekci našich výsledků pro steroidní polární konjugáty, sulfáty byly komerčně dostupné pouze pro menšinu zkoumaných steroidů. Z toho důvodu jsme tyto korekční faktory nepoužili. Ztráty steroidů nezávislé na odpovídajícím kroku hydrolýzy pak byly pokryty přidáním vnitřního standardu do rafinátu (vodné fáze) po extrakci nekonjugovaných steroidů (obsahující steroidní konjugáty) diethyléterem před hydrolýzou a dalším zpracováním rafinátu.

V.6 Teplotní a tlakové gradienty pro GC-MS analýzu trimethylsilyl-derivátů a retenční časy steroidů

Abychom účinně využili biologický materiál, jednotlivé vzorky byly použity v nezávislých zpracováních, pokaždé s uplatněním části vyšetřovaných steroidů. Volba steroidů měřených v individuálních zpracováních, teplotní a tlakové gradienty a volba efektivních hmotností použitých pro měření v módu selected ion monitoring (SIM) byly kompletně optimalizovány, aby bylo dosaženo minimálního limitu detekce (LOD) při dostatečné selektivitě.

Použitý teplotní gradient pro první, třetí a čtvrtý běh (G1, G3, G4): 1 min prodleva při 80 °C, zvýšení na 190 °C (40 °C/min), zvýšení na 210 °C (4 °C/min), zvýšení na 300 °C (20 °C/min), 5 min prodleva při 300 °C, počáteční tlak 34 kPa, teplota injektoru 220 °C, délka trvání analýzy 18,25 min.

Gradient použitý pro 2. běh (G2): zvýšení z 80 °C na 190 °C (40 °C/min), zvýšení na 205 °C (1,6 °C/min), zvýšení na 300 °C (40 °C/min), 5 minut prodleva při 300 °C, iniciální tlak 34 kPa, teplota injektoru 240 °C, délka trvání analýzy 19,5 min.

Gradient použitý pro 5. běh (G5): 1 min prodleva při 80 °C, zvýšení na 170 °C (40 °C/min), zvýšení na 180 °C (1 °C/min), zvýšení na 300 °C (40 °C/min), 5 minut prodleva při 300 °C, iniciální tlak 34 kPa, teplota injektoru 220 °C, délka trvání analýzy 21,5 min.

Gradient použitý pro 6. běh (G6): 1 minuta prodleva při 80 °C, zvýšení na 200 °C (40 °C/min), zvýšení na 240 °C (8 °C/min), zvýšení na 300 °C (40 °C/min), 5 minut prodleva při 300 °C, iniciální tlak 34 kPa, teplota injektoru 220 °C, délka trvání analýzy 15,5 min.

Efektivní hmotnosti, retenční časy chromatografických maxim, číslo sekvence pro skupiny steroidů a gradienty použité při kvantifikaci individuálních steroidů jsou uvedeny v publikaci Hill et al., 2010b.

V.7 Validace metodiky

Linearita byla doložena včetně rozmezí normálních hodnot zjištěných pro jednotlivé steroidy ve všech analyzovaných tělních tekutinách (nominální koncentrace analytu ± 20 %) s použitím

opakovaného ředění od nejvyšší koncentrace. Korelační koeficienty se pro jednotlivé steroidy pohybovaly od 0,9936 do 0,9999. Variabilita v rámci jedné analýzy (intra-assay) byla testována s použitím deseti replikátů získaných ze směsného vzorku mateřské plazmy. Variabilita mezi analýzami provedenými v různé dny (inter-assay) byla testována s použitím směsného vzorku mateřské plazmy v šesti nezávislých pokusech.

Limit detekce jednotlivých steroidů byl vypočten pomocí trojnásobku příslušného poměru poměru signál/šum (signal-to-noise ratio). Výtěžnost (recovery), tj. poměr mezi množstvím přidaných steroidů a množstvím detekovaných analýzou GC-MS byla zjištěna ze čtyř nezávislých měření. K jednotlivým směsným vzorkům tělních tekutin (plazma z pupečnickové arterie (UA), plazma z pupečnickové vény (UV), plazma z mateřské krve (MV) a plodová voda (AF)) byly přidány steroidy v množstvích přibližně trojnásobných proti středním hodnotám zjištěným pro jednotlivé steroidy a hodnoty výtěžnosti byly vyjádřeny v procentech naměřené koncentrace v poměru k vypočtené koncentraci. Výtěžnost se pohybovala mezi 70,9 % a 102 %. Výtěžnosti byla stanovena pro nekonjugované steroidy, neboť většina polárních konjugátů nebyla komerčně dostupná.

Ve všech případech byly směsi vnějších standardů a vnitřních standardů zpracovány stejným postupem jako vzorky. Směsi byly specifické pro každý nezávislý běh. Standardy byly nastříkovány v duplikátech ve třech rozdílných množstvích pro každý steroid (10, 100 a 1000 pg). S ohledem na dobrou linearitu u všech vyšetřovaných analytů byla kalibrační linie použita pro výpočet neznámých množství jednotlivých steroidů ve vzorcích.

V.8 Statistická analýza dat

Původní data byla ve své většině nesymetrická a vykazovala závislost rozptylu na koncentraci analytu (heteroscedasticita). Proto byla původní data před dalším zpracováním transformována směrem k symetrii a homoscedasticitě (konstantní rozptyl) mocninnou transformací s použitím statistického software Statgraphic Centurion, verze XV firmy Statpoint Inc. (Herdon, Virginie,

USA). Transformovaná data byla zpracována vícerozměrnou regresí s redukcí dimenzionality metodou ortogonálních projekcí do latentní struktury (OPLS) (Trygg et al., 2007).

Tato metoda je účinná při řešení problému silné multikolinearity v rámci matice nezávislých proměnných. V našem modelu byl jako závisle proměnná vybrán gestační věk, zatímco hladiny steroidů představovaly nezávisle proměnné. Model OPLS oddělil vysvětlenou variabilitu do dvou nezávislých komponent. První komponenta obsahovala variabilitu v hladinách steroidů sdílenou s gestačním věkem (prediktivní komponenta), zatímco druhá komponenta obsahovala variabilitu sdílenou mezi hladinami steroidů (ortogonální komponenta).

Model OPLS umožnil nalezení nejlepších prediktorů, stejně jako jejich nejlepší kombinaci pro predikci gestačního věku z hladin steroidů. S využitím uvedené metodiky jsme porovnávali prediktivitu steroidních hladin pro odhad gestačního věku v různých biologických tekutinách. Po standardizaci proměnných může lze model OPLS vyjádřit následovně:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_p \mathbf{P}_p^t + \mathbf{T}_0 \mathbf{P}_0^t + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}_p \mathbf{P}_p^t + \mathbf{F}$$

kde \mathbf{X} je matice s l nezávisle proměnnými a i subjekty, \mathbf{Y} je matice s m závisle proměnnými a i subjekty. V uvedených datech \mathbf{T}_p představuje vektor komponentních skóre v jediné prediktivní komponentě extrahovaný z \mathbf{Y} s i subjekty, \mathbf{T}_0 je vektor komponentních skóre v jediné prediktivní komponentě extrahovaný z \mathbf{X} s i subjekty. \mathbf{P}_p představuje vektor komponentních vah pro prediktivní komponentu extrahovaný z \mathbf{Y} a \mathbf{P}_0 je komponentních vah pro ortogonální komponentu extrahovaný z \mathbf{X} a l nezávisle proměnných, zatímco \mathbf{E} and \mathbf{F} jsou chybové členy.

Statistický software SIMCA-P v. 11.5 od firmy Umetrics AB (Umeå, Švédsko) použitý k analýze dat umožnil nalézt počet relevantních komponent pomocí kritéria *PRESS* (prediction error sum of squares) a také umožnil detekci vícerozměrných nehomogenit a testování vícerozměrného normálního rozdělení i prověření homoscedasticity (konstantní rozptyl) s využitím Hotellingových T^2 statistik a kvantil-kvantilových grafů pro normální rozdělení (normal probability plots) reziduí.

Pro hodnocení vztahů mezi hladinami steroidů, gestačním věkem (GA) a typem tělní tekutiny (BF) byl použit model ANOVA s opakováním. Tento model sestával z faktorů subjekt, BF (tři tělní tekutiny u každého subjektu), GA (probandi byli rozděleni do skupin podle GA při porodu) a interakce BF×GA následovaný vícenásobným porovnáváním metodou nejmenšího významného rozdílu.

VI. VÝSLEDKY

VI.1 Odhad gestačního věku z hladin steroidů

Jedním z cílů postgraduální práce bylo sledování vývoje v biosyntézy a metabolismu neuroaktivních steroidů v průběhu gestace a cílem navazujícím pak byl odhad změn v biosyntéze a metabolismu steroidů udržujících těhotenství i jejich katabolitů a antagonistů před nástupem porodu s využitím vícerozměrných regresních modelů s redukcí dimenzionality.

V této části práce bylo kvantifikováno 69 steroidů (Δ^5 steroidy, Δ^4 steroidy, $5\alpha/\beta$ -redukováné metabolity progesteronu, 20α -hydroxy-metabolity C21 steroidů, C19 $5\alpha/\beta$ -redukováné metabolity, $7\alpha/\beta$ -hydroxy-metabolity Δ^5 steroidů, estrogeny a 16α -hydroxy-metabolity Δ^5 steroidů a Δ^4 steroidů) metodou GC-MS v plazmě z pupečnickové arterie (UA), pupečnickové vény (UV), kubitální vény matky (MV) a v plodové vodě (AF) u 12 žen s fyziologickými porody v termínu, 38 žen rodících předčasně z důvodů patologií nesouvisejících se změnami steroidního metabolomu. S využitím vícerozměrné regrese s redukcí dimenzionality byly vytvořeny predikční modely pro odhad GA v jednotlivých tělních tekutinách plodu a v krvi matky.

Řada redukováných androstanových metabolitů, 7-hydroxy-metabolitů, Δ^5 steroidů, několik 20α -hydroxy-C21-steroidů, jejich konjugátů a 16α -hydroxytestosteron byly měřeny v tělních tekutinách plodu a matek poprvé. Hladiny steroidů, které již byly v některých z uvedených tělních tekutin v minulosti stanovovány jinými autory, se většinou shodovaly s hladinami námi zjištěnými v (Tab. 1).

Tabulka 1. Hladiny steroidů v pupečnickové arterii a pupečnickové větě u předčasných porodů a porodů v termínu vyjádřené jako mediány (kvartily)^a.

Steroid				GA při porodu			Rozdíly ^b , závislost na GA	
			týden 28–32 (A)	týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)			
Pregnenolon (U)** ^a	UA	nM	18.5 (16.7, 27.1)	19.8 (16.9, 23)	29.1 (21.1, 35.8)	A<C*, B<C*		↗
Pregnenolon (U)**	UV≈	nM	16.8 (15.3, 24.2)* ^c	21.3 (18.4, 30.8)	30.3 (23.8, 37.9)*	A<C***		↗
Pregnenolon (C)***	UA	μM	0.575 (0.341, 1.06)	1.97 (0.922, 3.38)	2.72 (2.1, 3.56)	A<B**, A<C***		↗
Pregnenolon (C)***	UV*** ^c ↓	μM	0.647 (0.364, 0.841)	1.78 (0.75, 3.49)**	2.39 (1.69, 2.93)**	A<B**, A<C***		↗
17-Hydroxypregnenolon (U)	UA	nM	20.7 (11.3, 39.6)	14.4 (9.64, 29.3)	27.8 (17.5, 45.6)			~
17-Hydroxypregnenolon (U)	UV***↓	nM	9.24 (5.06, 18.4)***	9.62 (4.6, 12.3)**	7.21 (4.74, 10.6)***			~
17-Hydroxypregnenolon (C)***	UA	nM	60 (43.4, 169)	913 (466, 1180)	469 (222, 934)	A<B***, A<C***		↗
17-Hydroxypregnenolon (C)***	UV≈	nM	61.6 (41.6, 117)	798 (379, 1260)	478 (224, 769)	A<B***, A<C***		↗
20α-Dihydroxypregnenolon (U)	UA	nM	1.97 (1.38, 2.55)	2.42 (1.96, 3.06)	2.48 (1.61, 3.03)			~
20α-Dihydroxypregnenolon (U)*	UV***↓	nM	1.1 (0.892, 1.67)**	1.74 (1.28, 3.07)	1.76 (1.33, 2.32)***	A<B*		↗
20α-Dihydroxypregnenolon (C)***	UA	μM	0.447 (0.289, 1.1)	1.37 (0.882, 1.9)	1.6 (1.11, 2.07)	A<B*, A<C***		↗
20α-Dihydroxypregnenolon (C)***	UV≈	μM	0.382 (0.269, 0.627)	1.48 (0.842, 1.89)	1.65 (1.19, 2.27)*	A<B***, A<C***		↗
16α-Hydroxypregnenolon (U)*	UA	nM	8.04 (6.22, 11.9)	9.54 (5.64, 11.8)	10.8 (8.3, 19.1)			~
16α-Hydroxypregnenolon (U)***	UV***↓	nM	1.83 (1.6, 2.26)***	2.51 (1.71, 3.96)***	3.68 (2.74, 5.57)***	A<C***		↗
16α-Hydroxypregnenolon (C)***	UA	nM	1.77 (1.38, 3.16)	6.88 (4.01, 15.1)	10.3 (6.03, 15.4)	A<B*, A<C***		↗
16α-Hydroxypregnenolon (C)***	UV≈	nM	2.29 (1.59, 5.18)	7.09 (3.43, 13.1)	8.53 (5.86, 14.2)	A<B*, A<C***		↗
Dehydroepiandrosteron (U)	UA	nM	7.63 (4.41, 10.1)	7.82 (3.68, 12.6)	9.85 (5.82, 15.6)			~
Dehydroepiandrosteron (U)*	UV***↓	nM	1.57 (1.03, 2.64)***	2.07 (1.46, 3.35)**	2.6 (1.88, 3.84)***	A<C*		↗
Dehydroepiandrosteron (C)***	UA	μM	0.569 (0.185, 0.791)	1.63 (0.702, 2.34)	1.51 (1.15, 2.53)	A<B**, A<C***		↗
Dehydroepiandrosteron (C)***	UV*↓	μM	0.547 (0.307, 0.966)*	1.6 (0.728, 2.15)	1.48 (0.917, 2.12)*	A<B**, A<C***		↗
16α-Hydroxy-DHEA (U)** ^a	UA	nM	1.95 (0.863, 3.89)	2.52 (2.17, 3.77)	7.1 (3.79, 20.1)	A<C***, B<C***		~
16α-Hydroxy-DHEA (U)***	UV*** ^c ↑	nM	4.45 (2.47, 5.26)*** ^c	5.8 (4.2, 7.41)***	24.8 (11.4, 52.7)***	A<C***, B<C***		↗
16α-Hydroxy-DHEA (C)	UA	μM	0.603 (0.079, 1.24)	0.549 (0.208, 1.28)	1.06 (0.281, 1.92)			↗
16α-Hydroxy-DHEA (C)**	UV***↑	μM	0.766 (0.39, 1.07)	0.655 (0.389, 1.83)*	2.35 (0.905, 4.67)**	A<C**, B<C*		↗
7α-Hydroxy-DHEA (U)	UA	nM	1.41 (1.03, 1.9)	1.55 (1.16, 2.09)	1.91 (1.45, 2.41)			~
7α-Hydroxy-DHEA (U)***	UV***↓	nM	1.02 (0.645, 1.5)*	1 (0.681, 1.37)*	1.52 (1.12, 2.18)	A<C**, B<C*		↗
7β-Hydroxy-DHEA (U)**	UA	nM	0.185 (0.080, 0.343)	0.156 (0.125, 0.221)	0.276 (0.21, 0.347)	A<C*, B<C*		↗
7β-Hydroxy-DHEA (U)***	UV***↓	nM	0.111 (0.032, 0.14)**	0.132 (0.084, 0.254)	0.218 (0.18, 0.271)***	A<C***		↗

Tabulka 1, pokračování. Hladiny steroidů v pupečnickové arterii a pupečnickové véně u předčasných porodů a porodů v termínu vyjádřené jako mediány (kvartily).

			GA při porodu			Rozdíly ^b , závislost na GA	
Steroid			týden 28–32 (A)	týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)		
Androstendiol (U)**	UA	pM	472 (409, 747)	363 (222, 469)	301 (184, 407)	A>C**	↘
Androstendiol (U)**	UV***↓	pM	240 (92, 352)**	146 (81.3, 279)**	96.9 (76.8, 137)***	A>C**	↘
Androstendiol (C)***	UA	μM	0.185 (0.149, 0.341)	1.33 (0.715, 2.84)	2.61 (1.73, 3.78)	A<B***, A<C***	↗
Androstendiol (C)***	UV**↑	μM	0.196 (0.147, 0.377)**	0.992 (0.718, 3.09)	2.66 (1.72, 4.1)***	A<B***, A<C***	↗
5-Androsten-3β,7α,17β-triol (U)***	UA	pM	8.92 (6.13, 19.4)	17.4 (12.7, 28.5)	25.6 (16.4, 46.3)	A<C***	↗
5-Androsten-3β,7α,17β-triol (U)**	UV***↓	pM	2.93 (1.29, 5.19)**	4.14 (3.14, 9.67)**	6.21 (3.67, 11.1)***	A<C**	↗
5-Androsten-3β,7α,17β-triol (C)***	UA	pM	50.7 (15.3, 84)	353 (239, 637)	504 (380, 799)	A<B***, A<C***	↗
5-Androsten-3β,7α,17β-triol (C)***	UV*↓	pM	45.9 (15.8, 89.2)	287 (145, 625)	474 (285, 662)*	A<B***, A<C***	↗
5-Androsten-3β,7β,17β-triol (U)*	UA	pM	9.18 (5.55, 16.9)	10.4 (7.65, 13)	15.4 (8.93, 28.2)	A<C*	↗
5-Androsten-3β,7β,17β-triol (U)**	UV***↓	pM	3.27 (2.29, 6.84)**	6.34 (4.45, 10.5)	7.28 (5.41, 11.5)***	A<C**	↗
5-Androsten-3β,7β,17β-triol (C)***	UA	pM	23.9 (16.1, 59.8)	179 (107, 374)	600 (421, 993)	A<B*, A<C***, B<C***	↗
5-Androsten-3β,7β,17β-triol (C)***	UV**↓	pM	33 (16.8, 56)	129 (88.7, 352)	484 (279, 760)*	A<B*, A<C***, B<C**	↗
Progesteron**	UA	μM	0.71 (0.404, 0.964)	0.51 (0.39, 0.622)	0.824 (0.533, 1.07)	B<C**	↗
Progesteron**	UV***↑	μM	0.946 (0.811, 1.57)**	1.08 (0.861, 1.23)***	1.44 (1, 2.1)***	B<C*	↗
17-Hydroxyprogesteron (U)***	UA	nM	27.1 (14.4, 33)	23.1 (18.2, 36.1)	52.2 (44, 73.1)	A<C***, B<C***	↗
17-Hydroxyprogesteron (U)***	UV***↑	nM	29.6 (20.7, 42.6)*	47.4 (35.7, 58.4)***	74.9 (50.9, 100)**	A<C***, B<C*	↗
17-Hydroxyprogesteron (C)*	UA	nM	9.34 (9.32, 42.5)	33.9 (22.1, 38.7)	47.1 (42.2, 57)	A<C*	↗
17-Hydroxyprogesteron (C)***	UV≈	nM	16.1 (12, 21.2)	27.5 (14.6, 37.1)	48.2 (38.8, 60.4)	A<C***, B<C*	↗
20α-Dihydroprogesteron (U)	UA	nM	91.7 (57.2, 118)	82.9 (66.8, 156)	88.1 (60.9, 123)		~
20α-Dihydroprogesteron (U)	UV***↓	nM	44.7 (32.2, 71.7)***	64 (37.8, 121)*	52.8 (36.2, 85.8)***		~
20α-Dihydroprogesteron (C)***	UA	nM	47.9 (29.1, 83.4)	84.1 (50.7, 118)	99.4 (77.8, 153)	A<C***	↗
20α-Dihydroprogesteron (C)***	UV≈	nM	44.1 (32.5, 93.9)	102 (81.7, 164)*	101 (80, 161)	A<B**, A<C***	↗
16α-Hydroxyprogesteron (U)***	UA	nM	53.5 (36.9, 82.8)	76.7 (40.6, 102)	163 (103, 234)	A<C***, B<C***	↗
16α-Hydroxyprogesteron (U)***	UV***↑	nM	78.5 (45.3, 110)**	105 (67.4, 182)***	273 (176, 411)***	A<C***, B<C***	↗
Estron (U)***	UA	nM	2.34 (1.61, 3.15)	4.64 (3.13, 8.92)	13.6 (7.55, 23.6)	A<B*, A<C***, B<C**	↗
Estron (U)***	UV***↑	nM	16.6 (10.6, 20.8)***	27.9 (17.2, 56.6)***	72.3 (45.1, 127)***	A<C***, B<C**	↗
Estron (C)***	UA	nM	39.1 (19.5, 62.4)	191 (107, 231)	122 (87.7, 217)	A<B***, A<C***	↗
Estron (C)***	UV*↓	nM	25.7 (17.7, 47.5)	138 (98.7, 199)	106 (82.9, 209)*	A<B***, A<C***	↗
16α-Hydroxyestron (U)***	UA	nM	0.168 (0.067, 0.554)	0.533 (0.376, 0.722)	1.62 (1.35, 2.27)	A<C***, B<C**	↗
16α-Hydroxyestron (U)***	UV***↑	nM	1.72 (1.33, 2.09)***	2.03 (1.39, 3.1)***	8.9 (6.27, 9.74)***	A<C***, B<C**	↗

Tabulka 1, pokračování. Hladiny steroidů v pupečnickové arterii a pupečnickové větě u předčasných porodů a porodů v termínu vyjádřené jako mediány (kvartily).

Steroid			GA při porodu			Rozdíly ^b , závislost na GA	
			týden 28–32 (A)	týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)		
Estradiol (U)***	UA	nM	0.915 (0.748, 1.38)	1.66 (1.02, 2.74)	3.05 (1.92, 6.17)	A<C***, B<C*	↗
Estradiol (U)***	UV***↑	nM	3.64 (2.61, 5.24)***	8.26 (3.41, 10.4)***	12.5 (6.62, 17.7)***	A<C***	↗
Estradiol (C)***	UA	nM	11.9 (8.91, 15.5)	26.4 (16.2, 34.6)	13.3 (8.3, 17.1)	A<B***, B>C***	↖
Estradiol (C)***	UV≈	nM	8.82 (6.87, 12.6)	22.8 (17.8, 30.8)	14.5 (9.45, 19.4)***	A<B***, A<C*, B>C**	↖
Estriol (U)***	UA	nM	11.8 (6.68, 18.4)	21.2 (11.6, 39)	49 (34, 75.4)	A<C***, B<C**	↗
Estriol (U)***	UV***↑	nM	70.4 (52.7, 107)***	103 (77, 168)***	216 (145, 308)***	A<C***, B<C**	↗
Estriol (C)***	UA	μM	1.04 (0.602, 1.25)	3.94 (3.23, 5.1)	2.87 (2.35, 3.94)	A<B***, A<C***	↗
Estriol (C)***	UV***↓	μM	0.676 (0.48, 1.01)***	3.55 (2.56, 4.63)	2.78 (2.09, 3.46)*	A<B***, A<C***	↗
Androstendion***	UA	nM	2.59 (0.984, 3.13)	1.32 (0.761, 2.27)	3.55 (2.67, 4.46)	A<C**, B<C***	↗
Androstendion***	UV***↓	nM	1.05 (0.6, 1.61)***	1.11 (0.676, 1.92)	2.03 (1.7, 2.6)***	A<C***, B<C**	↗
16α-Hydroxyandrostendion (U)***	UA	nM	2.47 (0.796, 3.08)	2.73 (1.61, 3.3)	11 (4.23, 18)	A<C***, B<C***	↗
16α-Hydroxyandrostendion (U)***	UV≈	nM	2.48 (1.71, 3.66)*	2.86 (1.59, 3.27)	9.71 (5.29, 15.1)	A<C***, B<C***	↗
Testosteron (U)**	UA	nM	4.02 (1.39, 6.99)	1.04 (0.687, 2.24)	1.32 (0.751, 1.78)	A>B*, A>C**	↘
Testosteron (U)	UV**↓	nM	1.61 (0.746, 3.06)***	0.915 (0.722, 1.26)	1.36 (0.893, 1.74)		~
16α-Hydroxytestosteron (U)***	UA	nM	6.54 (3.34, 12.2)	7.05 (4.96, 9.25)	13.6 (9.01, 22.5)	A<C***, B<C***	↗
16α-Hydroxytestosteron (U)***	UV≈	nM	3.12 (2.76, 8.65)*	5.49 (3.93, 11.8)	11.9 (9.35, 18.7)	A<C***, B<C**	↗
Androsteron (U)	UA	pM	139 (111, 191)	179 (91.3, 220)	158 (97.2, 213)		~
Androsteron (U)	UV***↓	pM	69.8 (41.9, 131)***	80.5 (61.1, 122)*	59.8 (41.1, 89.1)***		~
Androsteron (C)***	UA	nM	4.82 (2.5, 8.13)	14.8 (8.93, 20.4)	13.9 (10.9, 19.1)	A<B**, A<C***	↗
Androsteron (C)***	UV≈	nM	5.81 (3.5, 9.93)**	16.6 (11.2, 18.4)	14 (9.27, 19.1)	A<B**, A<C**	↗
Epiandrosteron (C)**	UA	nM	24.9 (6.63, 39)	49.7 (22.6, 65.8)	52.9 (41.4, 90.3)	A<C**	↗
Epiandrosteron (C)***	UV*↓	nM	22.9 (12.3, 31.4)	43.1 (24.8, 101)	52 (31.6, 79.2)*	A<B*, A<C***	↗
Etiocholanolon (U)	UA	pM	50.4 (36.7, 63.8)	38.3 (28.2, 48.9)	56.7 (27.8, 74)		~
Etiocholanolon (U)	UV≈	pM	46.5 (26.8, 74.5)	35.5 (24.8, 61.9)	50.1 (34.5, 71.6)		~
Etiocholanolon (C)*	UA	nM	0.77 (0.578, 2.41)	2.96 (1.28, 4.02)	2.58 (1.5, 3.57)	A<C*	↗
Etiocholanolon (C)	UV*↑	nM	1.37 (0.861, 2.46)**	2.99 (1.39, 4.42)	2.53 (1.34, 3.4)		~

Tabulka 1, pokračování. Hladiny steroidů v pupečnickové arterii a pupečnickové véně u předčasných porodů a porodů v termínu vyjádřené jako mediány (kvartily).

Steroid				GA při porodu			Rozdíly ^b , závislost na GA	
			týden 28–32 (A)	týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)			
5α-Androstan-3α,17β-diol (C)***	UA	nM	5.94 (3.66, 8.31)	25 (17.4, 37.7)	13.6 (8.34, 17.5)	A<B***, A<C**, B>C**		∩
5α-Androstan-3α,17β-diol (C)***	UV*↑	nM	6.24 (4.15, 9.6)*	22.1 (17.3, 45.5)	13.5 (9.79, 18.5)*	A<B***, A<C**, B>C**		∩
5α-Androstan-3β,17β-diol (C)***	UA	nM	2.27 (1.48, 3.73)	7.97 (5.84, 10.9)	4.37 (2.77, 8.05)	A<B***, A<C*, B>C*		∩
5α-Androstan-3β,17β-diol (C)***	UV≈	nM	2.33 (1.4, 4.42)	8.23 (5.07, 13)	5.84 (3.06, 7.98)	A<B***, A<C**		↗
5β-Androstan-3α,17β-diol (C)***	UA	nM	1.81 (1.45, 2.4)	5.72 (2.28, 10.4)	3.83 (3.08, 4.73)	A<B***, A<C***		↗
5β-Androstan-3α,17β-diol (C)***	UV≈	nM	1.8 (1.4, 2.18)	5.05 (3.17, 11.2)	3.86 (2.66, 5.15)	A<B***, A<C***		↗
5α-Dihydroprogesteron***	UA	nM	31.9 (21.5, 50.6)	23.6 (16.7, 34.2)	45.1 (29.2, 59.7)	B<C***		↗
5α-Dihydroprogesteron	UV≈	nM	35.9 (17.7, 45.8)	28.8 (21.5, 36)	36.9 (28.5, 58.6)			~
Allopregnanolon (U)	UA	nM	6.44 (4.14, 10)	4.93 (3.98, 6.38)	4.93 (3.61, 7.19)			~
Allopregnanolon (U)	UV≈	nM	5.51 (4.28, 7.24)	5.79 (5.26, 6.81)	4.44 (3.15, 6)*			~
Allopregnanolon (C)***	UA	nM	123 (69.4, 184)	421 (322, 671)	230 (179, 414)	A<B***, A<C**, B>C*		∩
Allopregnanolon (C)***	UV***↑	nM	144 (92.6, 225)***	562 (406, 927)**	287 (224, 442)***	A<B***, A<C**, B>C*		∩
Isopregnanolon (U)	UA	nM	11.6 (7.34, 17.5)	9.03 (6.66, 11.8)	9.71 (8.21, 13.7)			~
Isopregnanolon (U)	UV***↓	nM	6.69 (4.53, 8.7)***	6.84 (4.78, 10)*	6.74 (4.28, 10.5)***			~
Isopregnanolon (C)***	UA	nM	85.4 (56, 164)	289 (135, 482)	339 (255, 433)	A<B***, A<C***		↗
Isopregnanolon (C)***	UV≈	nM	81.1 (57.8, 198)	324 (167, 530)	302 (247, 464)	A<B***, A<C***		↗
5β-Dihydroprogesteron*	UA	nM	13.7 (8.81, 19.5)	7.4 (4.98, 10.2)	8.66 (5.81, 13.1)	A>B*		↘
5β-Dihydroprogesteron*	UV**↓	nM	12.3 (8.34, 16.9)	6.4 (5.32, 7.72)	7.38 (4.61, 12.1)**	A>B*		↘
Pregnanolon (U)**	UA	nM	16.7 (12.6, 21.8)	12 (8.4, 13.6)	10.3 (7.04, 14.9)	A>B*, A>C**		↘
Pregnanolon (U)*	UV***↓	nM	7.19 (4.6, 9.46)***	5.21 (4.12, 7.67)***	4.49 (2.91, 6.32)***	A>C*		↘
Pregnanolon (C)***	UA	nM	96.4 (67.6, 110)	259 (165, 355)	178 (144, 253)	A<B***, A<C***		↗
Pregnanolon (C)***	UV≈	nM	94.5 (67.7, 128)*	265 (176, 365)	187 (142, 238)	A<B***, A<C***		↗
Epipregnanolon (U)***	UA	nM	2.17 (1.39, 2.93)	1.35 (1.05, 1.67)	0.983 (0.699, 1.39)	A>C***		↘
Epipregnanolon (U)*	UV***↓	nM	1.32 (0.699, 1.43)***	0.739 (0.562, 1.12)***	0.611 (0.418, 1.02)***	A>C*		↘
Epipregnanolon (C)***	UA	nM	33.8 (21.5, 50.5)	67.7 (44.8, 112)	48.4 (39.8, 66.1)	A<B***, A<C*		↗
Epipregnanolon (C)***	UV***↑	nM	40.8 (22.5, 57.6)**	91 (57.6, 154)**	61.5 (46.3, 77.3)**	A<B***, A<C*		↗

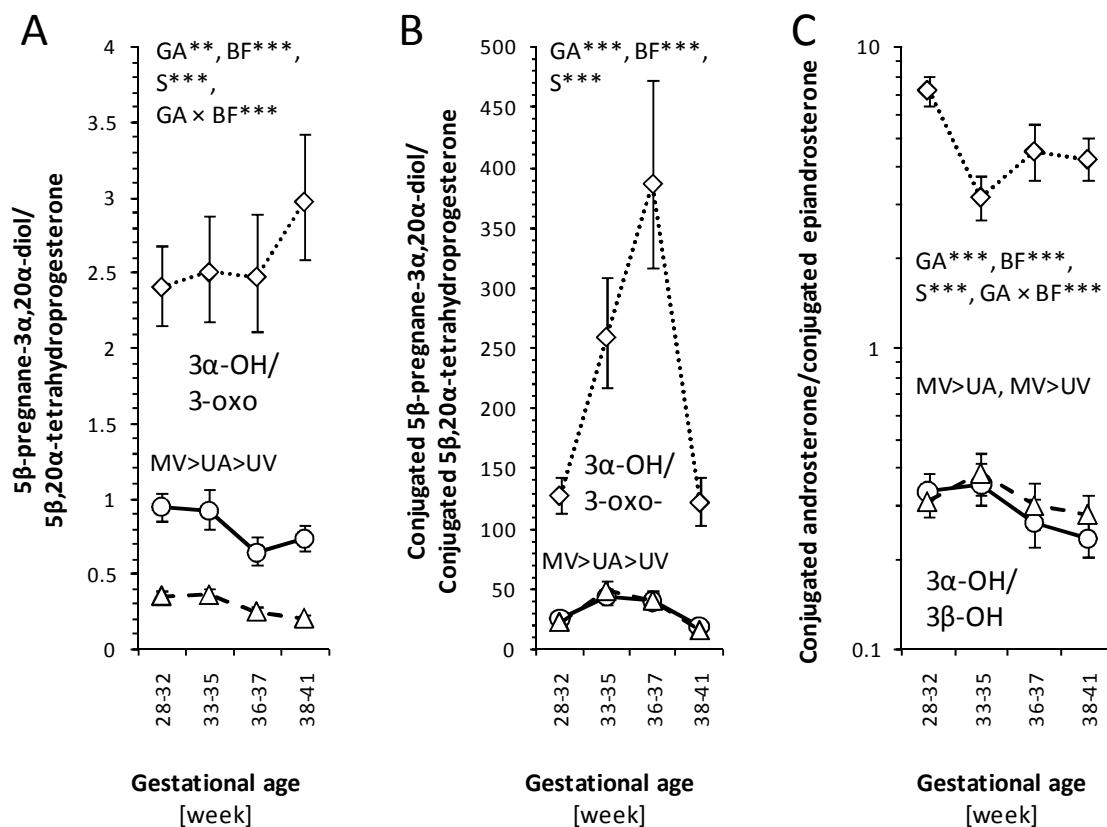
Tabulka 1, pokračování. Hladiny steroidů v pupečnickové arterii a pupečnickové véně u předčasných porodů a porodů v termínu vyjádřené jako mediány (kvartily).

Steroid			GA při porodu			Rozdíly ^b , závislost na GA	
			týden 28–32 (A)	týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)		
5α,20α-Tetrahydroprogesteron (U)	UA	nM	76.3 (58.1, 85.5)	60.6 (50.3, 102)	62.7 (41, 92.1)		~
5α,20α-Tetrahydroprogesteron (U)	UV***↓	nM	47.4 (40.4, 60.8)***	66.7 (42.1, 81.9)	47.1 (33.1, 66.1)***		~
5α,20α-Tetrahydroprogesteron (C)***	UA	nM	70.7 (55.5, 118)	197 (171, 307)	122 (74.2, 181)	A<B***, A<C*, B>C*	∩
5α,20α-Tetrahydroprogesteron (C)***	UV≈	nM	79.1 (67.4, 119)*	215 (166, 314)	119 (90, 157)	A<B***, B>C**	∩
5α-Pregnan-3α,20α-diol (U)	UA	nM	3.15 (1.81, 6.87)	2.73 (2.05, 3.13)	2.94 (2.57, 6.09)		~
5α-Pregnan-3α,20α-diol (U)	UV***↓	nM	1.74 (1.14, 4.36)***	1.96 (1.43, 2.52)*	2.05 (1.4, 2.62)***		~
5α-Pregnan-3α,20α-diol (C)***, ^d	UA	nM	776 (426, 1160)	2790 (1830, 3690)	949 (706, 1470)	A<B***, B>C***	∩
5α-Pregnan-3α,20α-diol (C)***	UV*** ^c ↑	nM	898 (575, 1360)***, ^c	2740 (1820, 4220)	1120 (804, 1530)***	A<B***, B>C***	∩
5α-Pregnan-3β,20α-diol (U)	UA	nM	2.71 (2.12, 3.4)	2.31 (1.81, 3.16)	2.43 (1.78, 3.56)		~
5α-Pregnan-3β,20α-diol (U)	UV≈	nM	2.1 (1.8, 2.62)**	2.45 (1.85, 3.48)	2.03 (1.45, 4.03)		~
5α-Pregnan-3β,20α-diol (C)***	UA	μM	0.919 (0.4, 1.35)	2.79 (1.72, 4.64)	1.78 (1.21, 2.26)	A<B***, A<C**	↗
5α-Pregnan-3β,20α-diol (C)***	UV***↑	μM	0.966 (0.574, 1.33)*	3.18 (2.34, 4.89)	1.78 (1.39, 2.5)**	A<B***, A<C**, B>C*	∩
5β,20α-Tetrahydroprogesteron (U)*	UA	nM	27.9 (18.2, 41.6)	20.8 (16.8, 26.7)	14.8 (9.38, 28.7)	A>C*	↘
5β,20α-Tetrahydroprogesteron (U)*	UV***↓	nM	20.6 (12.5, 32.1)**	17.4 (14.6, 24.6)*	11.8 (8.02, 21)***	A>C*	↘
5β,20α-Tetrahydroprogesteron (C)	UA	nM	40.7 (25.4, 74.7)	66.9 (45.2, 77.4)	45.6 (34.6, 80.9)		~
5β,20α-Tetrahydroprogesteron (C)	UV≈	nM	35.9 (26.9, 79.4)	56.2 (33.9, 88.2)	51.8 (37.4, 77.7)		~
5β-Pregnan-3α,20α-diol (U)***	UA	nM	25.6 (18.3, 34.6)	17.4 (12, 18.8)	12.4 (9.4, 15.3)	A>B*, A>C***	↘
5β-Pregnan-3α,20α-diol (U)***	UV***↓	nM	7.18 (4.4, 9.99)***	6.38 (4.18, 8.21)***	3.24 (2.45, 4.81)***	A>C***, B>C**	↘
5β-Pregnan-3α,20α-diol (C)***	UA	μM	1.02 (0.749, 1.5)	2.52 (1.81, 3.76)	1.39 (1.04, 2.25)	A<B***, B>C*	∩
5β-Pregnan-3α,20α-diol (C)***	UV≈	μM	1 (0.758, 1.3)	3.24 (2.08, 3.8)	1.13 (0.758, 1.77)	A<B***, B>C***	∩
5β-Pregnan-3β,20α-diol (U)*	UA	pM	775 (320, 964)	658 (454, 869)	419 (287, 595)		~
5β-Pregnan-3β,20α-diol (U)	UV***↓	pM	398 (159, 560)*	349 (264, 566)***	199 (151, 388)***		~
5β-Pregnan-3β,20α-diol (C)***	UA	nM	210 (124, 255)	449 (405, 727)	281 (202, 372)	A<B***, B>C**	∩
5β-Pregnan-3β,20α-diol (C)***	UV*↑	nM	198 (138, 268)*	579 (421, 795)	282 (212, 399)	A<B***, B>C***	∩

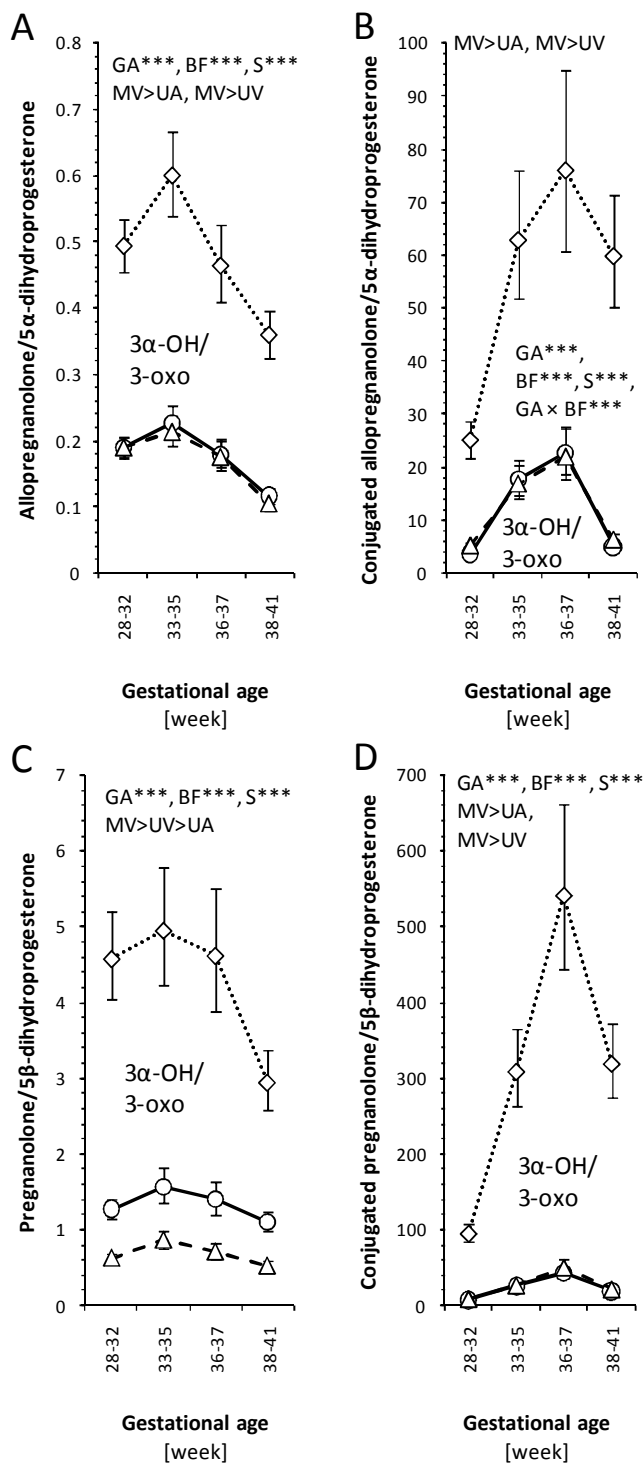
^aSoubor zahrnoval 80 žen (21–41 roků) při porodu od 28. do 41. Týdne gestace. Soubor byl rozdělen do tří kategorií podle GA při porodu. Skupina A, B, and C zahrnovala ženy rodící v týdnech 28–32 (n=19), 33–37 (n=19), a 38–42 (n=42) týdnech těhotenství. ↗ = vzrůstající trend s rostoucím GA, ~ = nezávislost na GA, ↘ = klesající trend s rostoucím GA, ∩ = maximum u skupiny B; ↑ = vyšší hodnoty v UV, ↓ = nižší hodnoty v UV, ≈ = nevýznamný rozdíl mezi UA and UV; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; ^bKruskal-Wallisův test; ^cvícenásobné porovnávání dle Dunna s Bonferroniho korekcí; ^dWilcoxonův párový test

VI.2 Enzymy steroidogenezy v těhotenství

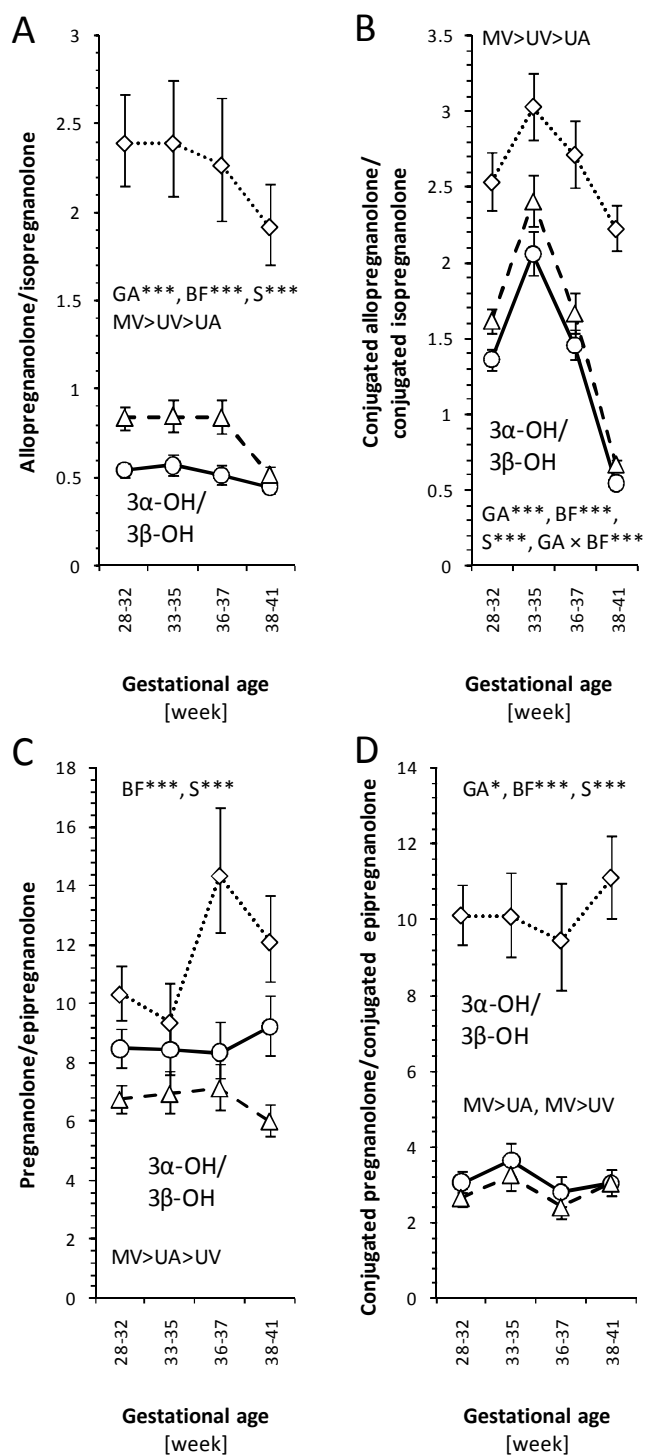
Cílem práce bylo rovněž sledování změn v biosyntéze a metabolismu steroidů udržujících těhotenství i jejich katabolitů a antagonistů před nástupem porodu. Tato část práce vycházela z několika nezodpovězených otázek ohledně tvorby progesteronu v lidském těhotenství ve světle nových poznatků plynoucích z multikomponentní plynově-chromatografické- hmotově-spektrometrické analýzy steroidů. Dále se práce zabývala vývojem steroidogenezy v posledním trimestru těhotenství s ohledem na stabilitu těhotenství (Obr. 3–7).



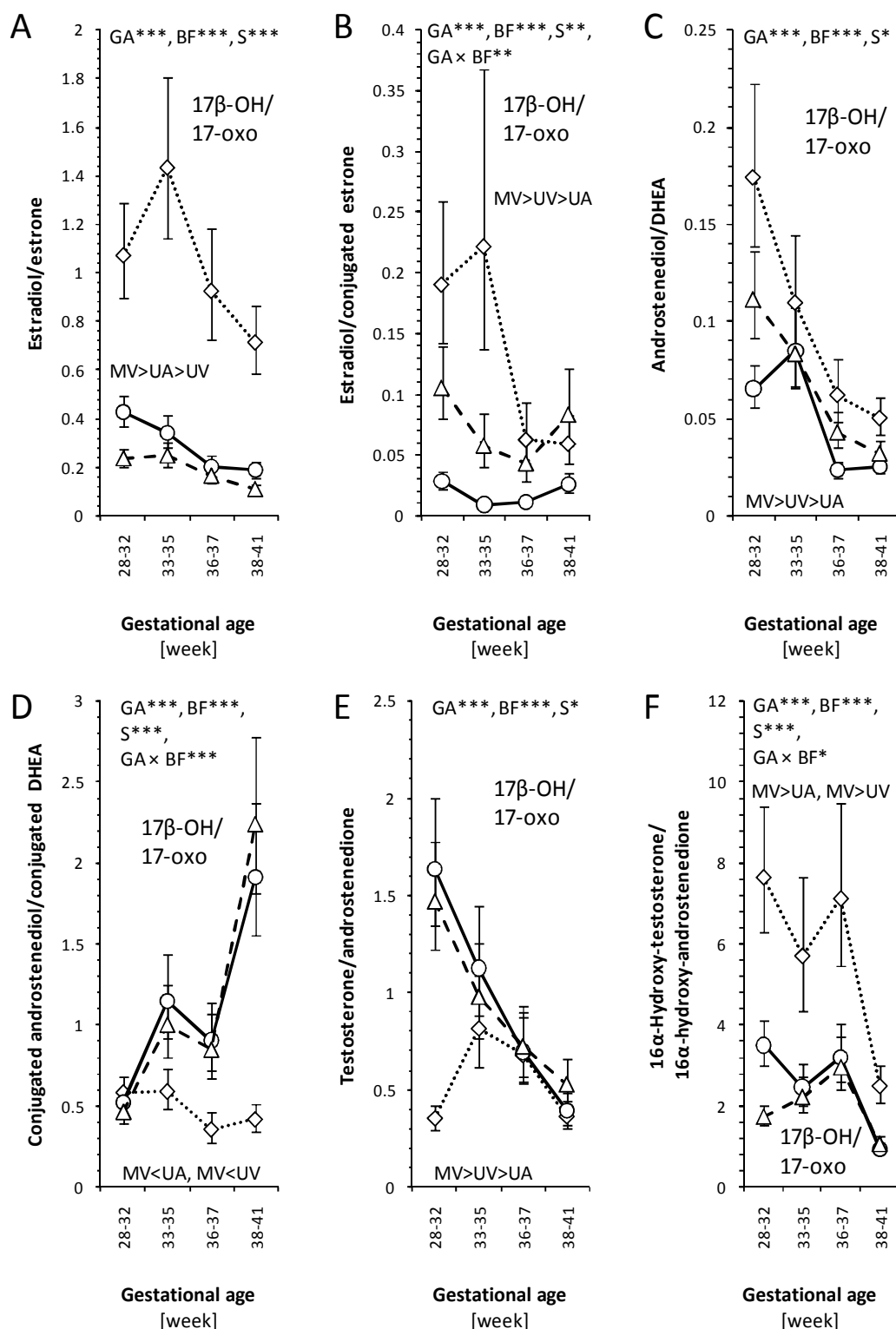
Obr. 3. Profily poměrů některých 20α-hydroxy-metabolitů 3α-hydroxy-5α/β pregnanových a androstanových metabolitů a jejich polárních konjugátů k jejich 3-oxo- a 3β-hydroxy-analogům v UA, UV a MV podle GA hodnocené modelem ANOVA s opakováním (viz Statistická analýza); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Chybové úsečky představují 95% intervaly spolehlivosti a symboly retransformované průměry (kroužky = UA, trojúhelníky = UV, čtverce = MV). Symbol ">" znamená „významně vyšší než“ a symbol "<" „významně nižší než“ ($p < 0,05$).



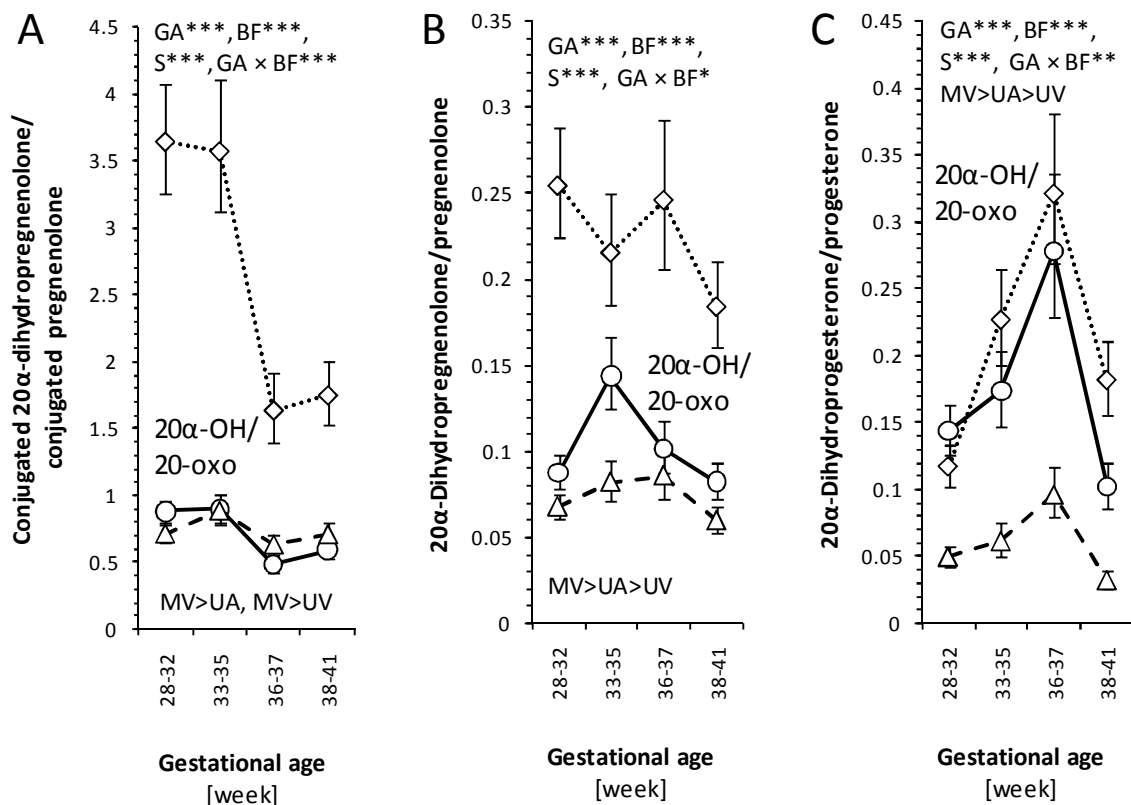
Obr. 4. Profily poměrů 3α-pregnanolonových izomerů (GABAergní) k jejich 3-oxo- analogům v UA, UV a MV podle GA hodnocené modelem ANOVA s opakováním (viz Statistická analýza); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Chybové úsečky představují 95% intervaly spolehlivosti a symboly retransformované průměry (kroužky = UA, trojúhelníky = UV, čtverce = MV). Symbol ">" znamená „významně vyšší než“ a symbol "<" „významně nižší než“ ($p < 0,05$).



Obr. 5. Profily poměrů 3 α -pregnanolonových izomerů (GABAergní) k jejich 3 β -analogům v UA, UV a MV podle GA hodnocené modelem ANOVA s opakováním (viz Statistická analýza); * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. Chybové úsečkami představují 95% intervaly spolehlivosti a symboly retransformované průměry (kroužky = UA, trojúhelníky = UV, čtverce = MV). Symbol ">" znamená „významně vyšší než“ a symbol "<" „významně nižší než“ (p <0,05).



Obr. 6. Profily poměrů 17 β -hydroxy- C18 and C19 steroidů a jejich polárních konjugátů k jejich 17-oxo- analogům v UA, UV a MV podle GA hodnocené modelem ANOVA s opakováním (viz Statistická analýza); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Chybové úsečky představují 95% intervaly spolehlivosti a symboly retransformované průměry (kroužky = UA, trojúhelníky = UV, čtverce = MV). Symbol ">" znamená „významně vyšší než“ a symbol "<" „významně nižší než“ ($p < 0,05$).



Obr.7. Profily poměrů konjugovaného 20 α -dihydropregnenolonu, volného 20 α -dihydropregnenolonu a 20 α -dihydroprogesteronu k jejich 20-oxo- analogům v UA, UV a MV podle GA hodnocené modelem ANOVA s opakováním (viz Statistická analýza); * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Chybové úsečkami představují 95% intervaly spolehlivosti a symboly retransformované průměry (kroužky = UA, trojúhelníky = UV, čtverce = MV). Symbol ">" znamená „významně vyšší než“ a symbol "<" „významně nižší než“ ($p<0,05$).

VI.3 Vývoj steroidogenezy v posledním trimestru těhotenství s ohledem na stabilitu těhotenství

Další část práce je věnovaná vývoji fetální steroidogenezy mezi 28.–41. týdnem gestace. Kromě zmapování steroidního metabolomu u plodu (Tab. 1) byly sledovány také poměry prekurzor produkt odrážející aktivity enzymů steroidogenezy (Tab. 2) a poměry konjugovaných steroidů k jejich volným analogům (Tab. 3).

Tabulka 2 Vztahy mezi gestačním věkem při porodu a poměry produkt/prekurzor u steroidů v krvi z pupečníkové artérie a pupečníkové vény odrážející aktivity steroidogenních enzymů vyjádřené jako mediány (kvartily).

Enzym		Poměry steroidů	Gestační věk při porodu			Rozdíly ^b , závislost na GA
			týden 28–32 (A)	týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)	
CYP17A1	UA	17-Hydroxypregnenolon/pregnenolon* (C)	0.137 (0.0677, 0.466)	0.377 (0.281, 0.502)	0.181 (0.0963, 0.309)	A<B*, B>C*
	UV≈	17-Hydroxypregnenolon/pregnenolon* (C)	0.0884 (0.0693, 0.293)	0.424 (0.265, 0.633)	0.208 (0.122, 0.356) **	A<B*
	UA	DHEA/17-Hydroxypregnenolon (C)	3.34 (1.58, 14.3)	1.77 (1.01, 3.86)	3.03 (2.1, 6.44)	~
	UV≈	DHEA/17-Hydroxypregnenolon* (C)	7.64 (3.23, 16.8) *	1.24 (1.18, 5)	2.45 (1.49, 5.04) **	A>B*
HSD3B5 ~ or ↗	UA	Progesteron/pregnenolon	30.7 (23.6, 44.1)	25 (18.8, 31.5)	31.1 (22.3, 44.2)	~
	UV***↑	Progesteron/pregnenolon	54.2 (49, 68.8)**	47.8 (31.2, 56.7)***	50 (38.5, 59.3)***	~
	UA	17-Hydroxyprogesteron/17-hydroxypregnenolon	1.34 (0.934, 2.34)	1.78 (0.587, 2.66)	2.4 (1.35, 3.75)	~
	UV***↑	17-Hydroxyprogesteron/17-hydroxypregnenolon***	3.45 (2.08, 5.8)**	6.28 (3.92, 10.8)***	11.1 (8.9, 12.8)***	A<C***
	UA	Androstendion/DHEA**	0.226 (0.172, 0.356)	0.189 (0.14, 0.254)	0.369 (0.218, 0.522)	B<C**
	UV***↑	Androstendion/DHEA*	0.615 (0.48, 0.79)***	0.498 (0.411, 0.727)***	0.819 (0.549, 1.17)***	B<C*
	UA	Testosteron/androstendiol	8.21 (3.29, 14.1)	3 (2.64, 7.2)	4.47 (2.18, 8.05)	~
	UV***↑	Testosteron/androstendiol	5.87 (3.36, 17)	7.52 (4.54, 12) **	13.8 (6.73, 20.3)***	~
CYP19A1 ↗	UA	Estron/androstendion***	1.05 (0.694, 2.49)	3.68 (2.74, 8.49)	3.37 (2.08, 7.79)	A<B**, A<C***
	UV***↑	Estron/androstendion**	17.1 (8.84, 23)***	27.2 (16.7, 45.7)***	32.7 (21.2, 51.3)***	A<C***
	UA	Estradiol/testosteron***	0.295 (0.161, 0.493)	1.52 (0.934, 1.89)	3.34 (1.14, 5.98)	A<B**, A<C***
	UV***↑	Estradiol/testosteron***	1.88 (1.11, 3.24)***	5.75 (4.57, 11.5)***	10.8 (7.25, 15.7)***	A<B**, A<C***
CYP3A7 ↗	UA	16α-Hydroxypregnenolon/pregnenolon	0.424 (0.314, 0.528)	0.457 (0.355, 0.505)	0.453 (0.338, 0.64)	~
	UV***↓	16α-Hydroxypregnenolon/pregnenolon	0.104 (0.0894, 0.124)***	0.134 (0.0946, 0.149)***	0.112 (0.0791, 0.178)***	~
	UA	16α-Hydroxyprogesteron/progesteron***	0.0859 (0.0597, 0.178)	0.154 (0.0949, 0.182)	0.204 (0.129, 0.26)	A<C***
	UV***↓	16α-Hydroxyprogesteron/progesteron***	0.0697 (0.0507, 0.115) *	0.126 (0.0714, 0.182) *	0.162 (0.119, 0.274)	A<C***
	UA	16α-Hydroxy-DHEA/DHEA*	0.298 (0.122, 0.536)	0.364 (0.28, 0.71)	0.777 (0.276, 2.49)	A<C*
	UV***↑	16α-Hydroxy-DHEA/DHEA***	3.02 (1.96, 4.01)***	3.42 (1.87, 3.6)***	7.81 (3.81, 23.7)***	A<C***, B<C**
	UA	16α-Androstendion/androstendion**	0.892 (0.347, 1.4)	2.23 (1.31, 3.04)	3.2 (1.51, 5.41)	A<C***
	UV***↑	16α-Androstendion/androstendion*	2.91 (1.64, 4.85)**	2.34 (1.39, 4.39)	4.98 (2.09, 7.61) **	~
	UA	16α-Hydroxytestosteron/testosteron***	1.97 (1.21, 3.83)	5.12 (3.3, 8.09)	11.3 (6.95, 20.1)	A<B*, A<C***, B<C*
	UV≈	16α-Hydroxytestosteron/testosteron***	3.09 (2.49, 4.6)	6.89 (2.79, 12.3)	10.9 (8.52, 19.1)	A<C***, B<C*
	UA	16α-Hydroxyestron/estron	0.080 (0.036, 0.176)	0.091 (0.053, 0.124)	0.106 (0.0615, 0.169)	~
	UV≈	16α-Hydroxyestron/estron	0.115 (0.079, 0.177)	0.084 (0.050, 0.109)	0.073 (0.059, 0.138) *	~
	UA	Estril/estradiol	12.1 (7.51, 15)	11.8 (10.2, 22.6)	16.2 (10.5, 23.9)	~
	UV**↑	Estril/estradiol	21.6 (11.8, 44) **	15.6 (9.48, 27.8)	17.3 (12.8, 26.4)	~
SRD5A5	UA	5α-Dihydroprogesteron/progesteron	0.052 (0.039, 0.056)	0.043 (0.036, 0.058)	0.057 (0.041, 0.073)	~
	UV***↓	5α-Dihydroprogesteron/progesteron	0.0267 (0.0211, 0.0354)**	0.025 (0.021, 0.039)***	0.0275 (0.0187, 0.0348)***	~
	UA	5α,20α-Tetrahydroprogesteron/20α-dihydroprogesteron	0.787 (0.733, 0.997)	0.669 (0.558, 0.778)	0.709 (0.589, 0.835)	~
	UV***↑	5α,20α-Tetrahydroprogesteron/20α-dihydroprogesteron	0.978 (0.752, 1.32) **	0.842 (0.608, 1.07) **	0.884 (0.666, 1.1)**	~
AKR1D1 ↘	UA	5β-Dihydroprogesteron/progesteron**	0.021 (0.017, 0.031)	0.016 (0.010, 0.0187)	0.012 (0.007, 0.019)	A>C**
	UV***↓	5β-Dihydroprogesteron/progesteron***	0.011 (0.001, 0.016)***	0.0064 (0.005, 0.010)***	0.0046 (0.0035, 0.0074)***	A>C***
	UA	5β,20α-Tetrahydroprogesteron/20α-dihydroprogesteron*	0.383 (0.21, 0.465)	0.224 (0.121, 0.308)	0.15 (0.113, 0.253)	A>C*
	UV***↑	5β,20α-Tetrahydroprogesteron/20α-dihydroprogesteron**	0.444 (0.251, 0.608) ***	0.3 (0.158, 0.45) **	0.205 (0.147, 0.3) ***	A>C**

Tabulka 2, pokračování. Vztahy mezi gestačním věkem při porodu a poměry produkt/prekurzor u steroidů v krvi z pupečnickové artérie a pupečnickové vény odrážející aktivity steroidogenních enzymů.

Enzym	Poměry steroidů	Gestační věk při porodu			Rozdíly ^b , závislost na GA	
		týden 28–32 (A)	týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)		
HSD17Bs + AKR1Cs, redukce Δ , oxidace Δ	UA Allopregnanolon/5 α -dihydroprogesteron***a	0.2 (0.169, 0.225)	0.21 (0.189, 0.233)	0.119 (0.1, 0.145)	A>C***, B>C***	↘
	UV \approx Allopregnanolon/5 α -dihydroprogesteron***	0.188 (0.148, 0.232)	0.192 (0.168, 0.265)	0.113 (0.091, 0.139)	A>C***, B>C***	↘
	UA Pregnanolon/5 β -dihydroprogesteron	1.32 (1.14, 1.63)	1.45 (1.21, 1.74)	1.18 (0.902, 1.44)		~
	UV***↓ Pregnanolon/5 β -dihydroprogesteron*	0.601 (0.484, 0.878)***	0.836 (0.67, 1.11)**	0.577 (0.447, 0.794)***	B>C*	↘
	UA Allopregnanolon/isopregnanolon*	0.553 (0.468, 0.635)	0.536 (0.502, 0.592)	0.503 (0.418, 0.566)		↘
	UV***↑ Allopregnanolon/isopregnanolon**	0.8 (0.683, 0.983)**	0.991 (0.602, 1.13)***	0.574 (0.464, 0.918)***	A>C*, B>C*	↘
	UA Pregnanolon/epipregnanolon	8.32 (7.81, 9.51)	8.34 (7.27, 9.73)	10 (8.11, 12.3)		~
	UV***↓ Pregnanolon/epipregnanolon	6.66 (5.89, 7.86)**	6.78 (5.67, 8.17)	6.77 (5.41, 8.24)***		~
	UA 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 α ,20 α -tetrahydroprogesteron	0.0373 (0.0276, 0.0876)	0.0419 (0.0304, 0.0516)	0.0523 (0.0352, 0.072)		~
	UV*↓ 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 α ,20 α -tetrahydroprogesteron	0.0363 (0.0229, 0.0882)	0.0315 (0.0262, 0.0467)	0.0401 (0.027, 0.0526)*		~
	UA 5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 β ,20 α -tetrahydroprogesteron	0.983 (0.739, 1.13)	0.733 (0.616, 0.91)	0.789 (0.602, 0.981)		~
	UV***↓ 5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 β ,20 α -tetrahydroprogesteron	0.304 (0.25, 0.516)***	0.284 (0.234, 0.498)**	0.278 (0.206, 0.363)***		~
	UA 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 α -pregnan-3 β ,20 α -diol	1.12 (0.885, 2.32)	1.1 (1.03, 1.25)	1.31 (0.99, 1.83)		~
	UV***↓ 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 α -pregnan-3 β ,20 α -diol	1.02 (0.586, 2.02)	1.08 (0.506, 1.26)	0.823 (0.467, 1.19)***		~
	UA 5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 β -pregnan-3 β ,20 α -diol**	40.6 (28.8, 70.8)	25.9 (19.8, 27.8)	28.1 (24, 37.7)	A>B**	↘
	UV***↓ 5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol/5 β -pregnan-3 β ,20 α -diol	20.4 (15, 70.8)	15.1 (11.3, 24.3)**	14.6 (11.4, 19.1)***		~
	UA Androstendiol/DHEA***	0.0656 (0.0525, 0.0913)	0.0334 (0.0236, 0.0909)	0.0271 (0.021, 0.0391)	A>B*, A>C***	↘
	UV***↑ Androstendiol/DHEA***	0.121 (0.0819, 0.193)**	0.0724 (0.0347, 0.132)	0.0335 (0.0261, 0.0473) **	A>C***, B>C**	↘
	UA Testosteron/androstendion***	2.36 (1.36, 3.05)	1.01 (0.542, 1.52)	0.35 (0.208, 0.478)	A>C***, B>C**	↘
	UV \approx Testosteron/androstendion***	1.69 (0.959, 2.86)	0.938 (0.491, 1.39)	0.578 (0.413, 0.834)**	A>C***	↘
	UA Estradiol/estron***	0.434 (0.381, 0.561)	0.258 (0.171, 0.499)	0.214 (0.186, 0.275)	A>C***	↘
	UV***↓ Estradiol/estron*	0.183 (0.153, 0.365)***	0.175 (0.117, 0.511)	0.137 (0.103, 0.194)***	A>C*	↘
	UA 20 α -Dihydropregnenolon/pregnenolon*	0.078 (0.066, 0.136)	0.127 (0.093, 0.138)	0.081 (0.064, 0.123)	B>C*	↘
	UV***↓ 20 α -Dihydropregnenolon/pregnenolon**	0.0597 (0.0514, 0.0823)*	0.0764 (0.0576, 0.122)*	0.0506 (0.0402, 0.0713)***	B>C**	↘
	UA 20 α -Dihydroprogesteron/progesteron**	0.151 (0.010, 0.192)	0.19 (0.138, 0.308)	0.112 (0.072, 0.153)	B>C**	↘
	UV***↓ 20 α -Dihydroprogesteron/progesteron*	0.037 (0.028, 0.092)***	0.075 (0.051, 0.121)**	0.032 (0.026, 0.054)***	B>C*	↘
	UA 5 α ,20 α -Tetrahydroprogesteron/5 α -dihydroprogesteron***	2.42 (1.94, 2.77)	2.78 (2.31, 3.7)	1.48 (1.21, 1.87)	A>C***, B>C***	↘
	UV***↓ 5 α ,20 α -Tetrahydroprogesteron/5 α -dihydroprogesteron***	1.61 (1.18, 2.32)**	2.02 (1.68, 2.44)**	1.24 (1.05, 1.45)***	A>C*, B>C***	↘
	UA 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol/allopregnanolon	0.47 (0.409, 0.955)	0.567 (0.419, 0.697)	0.557 (0.499, 0.837)		~
	UV***↓ 5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol/allopregnanolon	0.367 (0.22, 0.755) *	0.359 (0.269, 0.426)***	0.406 (0.358, 0.568)***		~
	UA 5 α -Pregnan-3 β ,20 α -diol/isopregnanolon	0.223 (0.196, 0.288)	0.265 (0.224, 0.355)	0.241 (0.196, 0.298)		~
	UV***↑ 5 α -Pregnan-3 β ,20 α -diol/isopregnanolon	0.295 (0.244, 0.452)**	0.348 (0.244, 0.526) **	0.316 (0.252, 0.426)***		~
	UA 5 β ,20 α -Tetrahydroprogesteron/5 β -dihydroprogesteron**	2.12 (1.63, 2.79)	2.81 (2.17, 4.24)	1.73 (1.29, 2.15)	B>C*	↘
	UV \approx 5 β ,20 α -Tetrahydroprogesteron/5 β -dihydroprogesteron***	1.95 (1.33, 2.66)	2.72 (2.17, 3.47)	1.69 (1.28, 2.08)	A<B*, B>C***	↗
	UA 5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol/pregnanolon*	1.54 (1.21, 2.15)	1.47 (1, 1.86)	1.17 (0.935, 1.42)		↘
	UV***↓ 5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol/pregnanolon**	1.12 (0.721, 1.5)***	0.968 (0.858, 1.42)**	0.773 (0.625, 1.02)***	A>C*, B>C*	↘
	UA 5 β -Pregnan-3 β ,20 α -diol/epipregnanolon**	0.292 (0.198, 0.425)	0.509 (0.36, 0.626)	0.396 (0.313, 0.44)	A<B**	↘
	UV \approx 5 β -Pregnan-3 β ,20 α -diol/epipregnanolon	0.292 (0.173, 0.424)	0.441 (0.27, 0.626)	0.376 (0.239, 0.474)		~

\nearrow = vzrůstající trend s GA, ~ = nevýznamná změna s GA, \searrow = klesající trend s GA, \cap = maximum ve skupině B; \uparrow = vyšší hodnoty v UV, \downarrow = nižší hodnoty v UV, \approx = nevýznamný rozdíl mezi UA a UV;

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; ^aKruskal-Wallisův test; ^bvícenásobná porovnávání dle Dunna s Bonferroniho korekcí; ^cWilcoxonův párový test

Tabulka 3. Vztahy mezi GA u předčasných porodů a porodů v termínu a poměry polární konjugáty steroidu k volným steroidům v krvi z pupečnickové arterie a pupečnickové vény vyjádřené jako medián (kvartily).

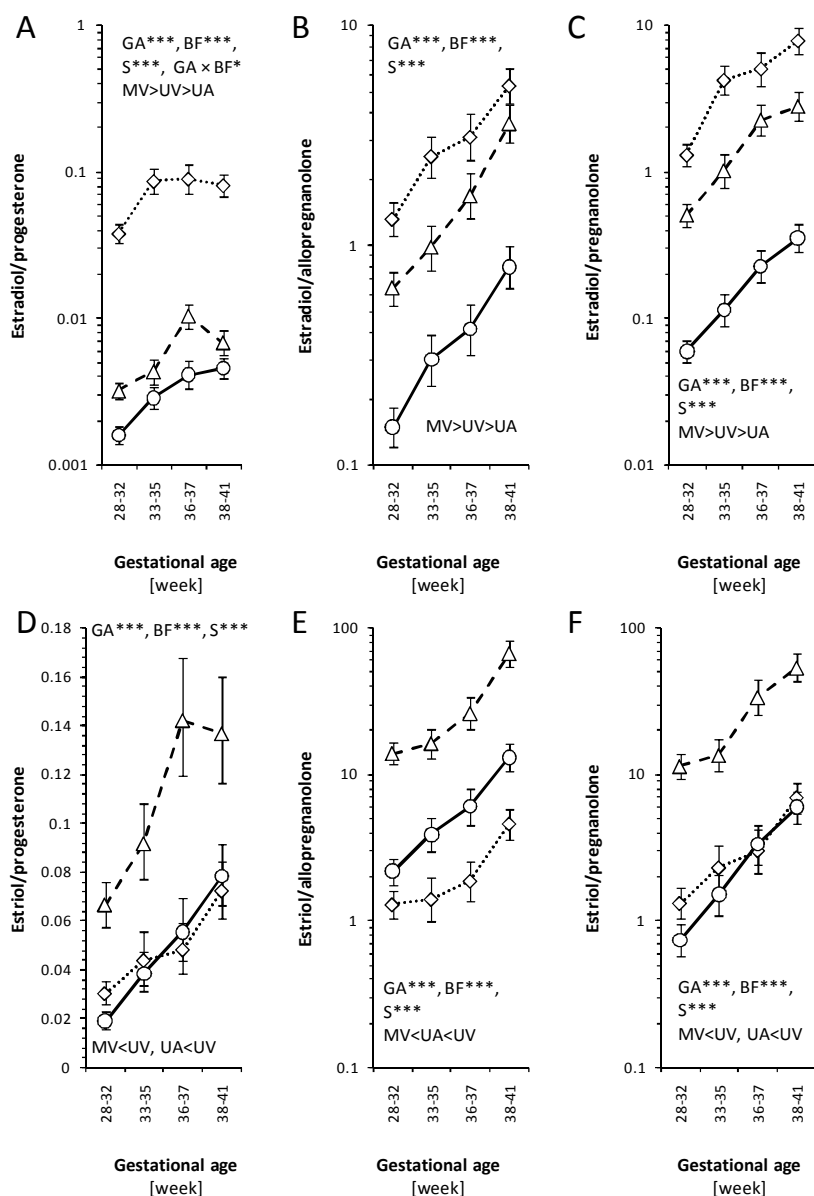
Conjugated/unconjugated steroid		týden 28–32 (A)	GA at labor týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)	Differences ^b , dependence on GA	
Pregnenolon*** ^a	UA	30.9 (15.8, 43.2)	108 (56.5, 168)	95.1 (69, 129)	A<B***, A<C***	↗
Pregnenolon***	UV** ^c ↓	33.9 (23, 54.1)* ^c	91.2 (36, 132)*	70.3 (54.2, 112)*	A<B**, A<C***	↗
17-Hydroxypregnenolon***	UA	3.94 (2.1, 9.89)	35.4 (21.6, 75.2)	17.9 (7.99, 31.9)	A<B***, A<C**, B>C***	∩
17-Hydroxypregnenolon***	UV*** ↑	8.59 (5.45, 16.4)**	77.4 (35.7, 168)**	49.9 (31.6, 138)***	A<B***, A<C***	↗
20α-Dihydropregnenolon***	UA	255 (178, 442)	498 (394, 775)	606 (478, 915)	A<C***	↗
20α-Dihydropregnenolon***	UV*** ↑	336 (206, 516)	693 (516, 922)*	926 (715, 1190)***	A<C***	↗
16α-Hydroxypregnenolon***	UA	0.252 (0.149, 0.328)	0.922 (0.371, 1.52)	0.798 (0.465, 1.41)	A<B**, A<C***	↗
16α-Hydroxypregnenolon*	UV*** ↑	1.24 (0.968, 2.43)**	2.73 (1.22, 4.24)***	2.43 (1.73, 4.43)***	A<C*	↗
Dehydroepiandrosteron***	UA	62.5 (36.4, 84.3)	205 (176, 355)	153 (109, 224)	A<B***, A<C***	↗
Dehydroepiandrosteron*	UV*** ↑	341 (213, 533)***	739 (406, 964)***	556 (279, 809)***	A<B*	↗
16α-Hydroxy-DHEA	UA	146 (38, 725)	194 (92.4, 417)	137 (45.5, 221)		~
16α-Hydroxy-DHEA	UV** ↓	149 (93.6, 372)	127 (81.1, 217)*	91 (33.5, 170)		~
Androstendiol***	UA	426 (310, 675)	5040 (1520, 10000)	10600 (5880, 13600)	A<B***, A<C***	↗
Androstendiol***	UV*** ↑	1750 (601, 2560)***	10400 (2090, 19400)**	32700 (15900, 46000)***	A<B**, A<C***, B<C**	↗
5-Androsten-3β,7α,17β-triol***	UA	3.93 (1.42, 7.58)	16.6 (10.6, 35.1)	23.1 (11.2, 37.6)	A<B***, A<C***	↗
5-Androsten-3β,7α,17β-triol***	UV*** ↑	11.6 (5.79, 33.5)***	53.7 (23.1, 152)**	56 (35.4, 100)***	A<B*, A<C***	↗
5-Androsten-3β,7β,17β-triol***	UA	2.91 (1.6, 4.63)	19.7 (8.3, 33.7)	37.7 (24.3, 58.4)	A<B**, A<C***	↗
5-Androsten-3β,7β,17β-triol***	UV*** ↑	6.62 (4.26, 17.8)***	20.5 (7.63, 38.3)	59.3 (35.9, 116)**	A<C***, B<C**	↗
17-Hydroxyprogesteron	UA	0.34 (0.325, 0.706)	0.764 (0.688, 1.12)	0.868 (0.684, 1.04)		~
17-Hydroxyprogesteron	UV*** ↓	0.464 (0.317, 0.636)	0.48 (0.447, 0.637)*	0.749 (0.455, 0.902)**		~
20α-Dihydroprogesteron***	UA	0.494 (0.392, 0.713)	0.883 (0.669, 1.09)	1.12 (0.725, 1.75)	A<C***	↗
20α-Dihydroprogesteron*	UV*** ↑	0.943 (0.576, 1.65)***	1.73 (0.937, 2.26)***	1.95 (1.26, 2.9)***	A<C*	↗
Androsteron**	UA	33 (14.4, 61.9)	83 (60.5, 188)	81.2 (53.7, 166)	A<B*, A<C**	↗
Androsteron**	UV*** ↑	78 (39, 165)***	172 (141, 361)***	231 (122, 321)***	A<B*, A<C**	↗
Etiocholanolon*	UA	22.2 (8.98, 57.3)	68.8 (41.5, 112)	45.3 (29.4, 93.8)	A<B*, A<C*	↗
Etiocholanolon	UV≈	35.6 (13.7, 72.4)	57.3 (33.8, 109)	49.8 (24.2, 81.1)		~

Tabulka 3, pokračování. Vztahy mezi GA u předčasných porodů a porodů v termínu a poměry polární konjugáty steroidu k volným steroidům v krvi z pupečnickové arterie a pupečnickové vény vyjádřené jako medián (kvartily).

Conjugated/unconjugated steroid		týden 28–32 (A)	GA at labor týden 33–37 (B)	týden 38–42 (C)	Differences ^b , dependence on GA	
Estron***	UA	17 (8.15, 24.7)	31.7 (12.1, 46.3)	8.01 (5.17, 14.3)	B>C***	↘
Estron***	UV*** ↓	2.18 (1.18, 3.13)***	5.64 (2.16, 9.06)***	1.56 (0.99, 2.28)***	B>C***	↘
Estradiol***	UA	10.8 (9.39, 15.5)	12.5 (9.83, 25.9)	3.53 (2.37, 5.31)	A>C***, B>C***	↘
Estradiol***	UV*** ↓	2.77 (1.96, 3.13)***	3.19 (2.55, 4.18)***	1.2 (0.993, 1.54)***	A>C***, B>C***	↘
Estriol***	UA	89.9 (49.4, 120)	178 (89.8, 330)	65.7 (35.6, 98.1)	A<B*, B>C***	↗
Estriol***	UV*** ↓	8.43 (6.24, 14.2)***	32.8 (23.3, 47.1)***	12.1 (8.47, 17.6)***	A<B***, B>C***	↗
Allopregnanolon***	UA	16.5 (13, 27.1)	102 (68.3, 155)	41.8 (34.2, 63.5)	A<B***, A<C***, B>C**	↗
Allopregnanolon***	UV*** ↑	26 (19.7, 38.2)**	104 (63.3, 224)	65.3 (44, 81.9)***	A<B***, A<C***	↗
Isopregnanolon***	UA	7.82 (5.13, 12)	28.8 (19.9, 54.5)	30.7 (22.6, 42)	A<B***, A<C***	↗
Isopregnanolon***	UV*** ↑	15 (9.73, 22.8)***	44.4 (28.4, 63.1)**	46.8 (29.7, 67.2)***	A<B***, A<C***	↗
Pregnanolon***	UA	4.75 (3.42, 8.52)	22.3 (13.9, 40.6)	16.8 (12.1, 24.7)	A<B***, A<C***	↗
Pregnanolon***	UV*** ↑	14.6 (8.77, 21.3)***	42.4 (30.3, 94.4)***	41.4 (33.6, 56.5)***	A<B***, A<C***	↗
Epipregnanolon***	UA	12 (10.4, 18.9)	64.9 (31.8, 126)	46.9 (36.1, 66.3)	A<B***, A<C***	↗
Epipregnanolon***	UV*** ↑	29.9 (20.5, 52)***	128 (44, 244)***	87.2 (66.4, 136)***	A<B***, A<C**	↗
5α,20α-Tetrahydroprogesteron***	UA	1.08 (0.666, 1.72)	3.02 (2.17, 4.23)	1.77 (1.19, 2.35)	A<B***, A<C*, B>C*	↗
5α,20α-Tetrahydroprogesteron**	UV*** ↑	1.66 (1.17, 2.5)***	3.74 (2.24, 5.92)*	2.23 (1.71, 3.59)*	A<B**	↗
5α-Pregnan-3α,20α-diol***	UA	229 (102, 408)	1100 (623, 1480)	247 (185, 354)	A<B***, B>C***	↗
5α-Pregnan-3α,20α-diol***	UV*** ↑	439 (215, 660)***	1460 (1020, 1930)**	470 (364, 962)***	A<B***, B>C**	↗
5α-Pregnan-3β,20α-diol***	UA	316 (185, 437)	1280 (891, 1610)	636 (453, 975)	A<B***, A<C**, B>C*	↗
5α-Pregnan-3β,20α-diol***	UV*** ↑	476 (251, 819)**	1340 (879, 1920)	773 (519, 1030)*	A<B***, B>C*	↗
5β,20α-Tetrahydroprogesteron*	UA	1.26 (0.835, 3.67)	3.34 (2.31, 3.69)	3.03 (2.15, 4.78)	A<C*	↗
5β,20α-Tetrahydroprogesteron*	UV*** ↑	2.15 (1.24, 5.68)*	3.63 (2.34, 5.17)	4.3 (2.58, 7.57)*	A<C*	↗
5β-Pregnan-3α,20α-diol***	UA	40.7 (28.8, 55.5)	160 (133, 227)	113 (85.6, 194)	A<B***, A<C***	↗
5β-Pregnan-3α,20α-diol***	UV*** ↑	153 (97.1, 224)***	521 (363, 629)***	363 (225, 483)***	A<B***, A<C**	↗
5β-Pregnan-3β,20α-diol*	UA	285 (169, 766)	816 (541, 1270)	723 (508, 1030)	A<B*, A<C*	↗
5β-Pregnan-3β,20α-diol	UV*** ↑	501 (312, 2130)*	1510 (968, 3040)***	1300 (825, 2040)***		~

↗ = vzrůstající trend s GA, ~ = nevýznamná změna s GA, ↘ = klesající trend s GA, ∩ = maximum ve skupině B; ↑ = vyšší hodnoty v UV, ↓ = nižší hodnoty v UV, ≈ = nevýznamný rozdíl mezi UA a UV; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; ^aKruskal-Wallisův test; ^bvícenásobná porovnávání dle Dunna s Bonferroniho korekcí; ^cWilcoxonův párový test

U plodu byla mimo jiné nalezena významná tendence k vyšší produkci aktivního gestagenu a nižší produkci aktivního estrogenu a aktivních GABA-ergních steroidů s přibližujícím se termínem porodu. Na druhé straně poměry porod indukujících estrogenů k těhotenství udržujícím gestagenům a GABA-ergním steroidům vykazují významný vzrůst s rostoucím GA v UV, UA i MV (Obr. 8). Výsledky rovněž ukazují rostoucí poměr steroidních polárních konjugátů (sulfátů a glukuronidů).



Obr. 8. Profily poměrů estradiolu a estriolu k progesteronu a ke GABA-ergním 3α-pregnanolonovým izomerům v UA, UV a MV podle GA. Symboly viz Obr. 5.

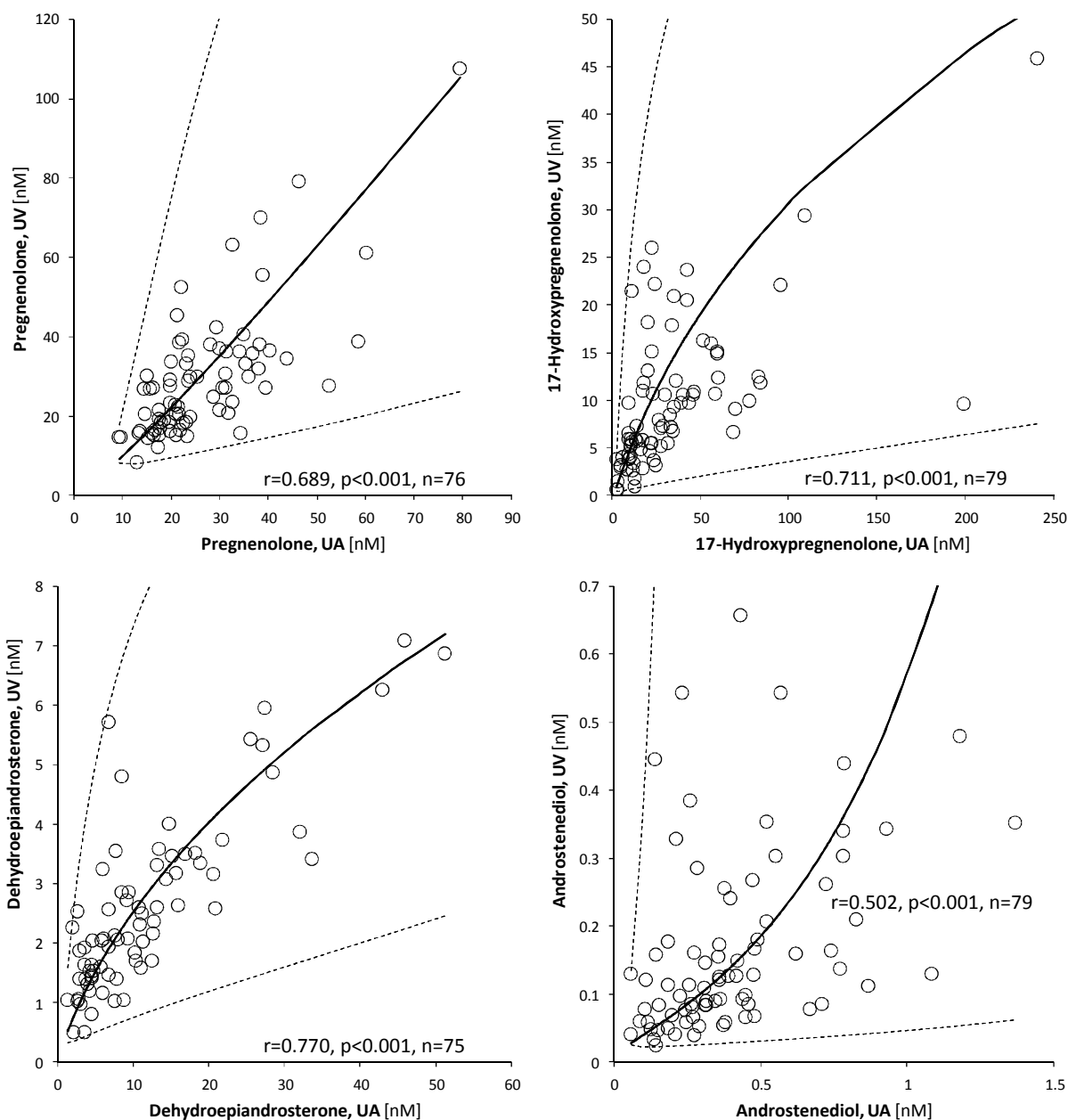
VI.4 Rozdíly mezi pupečnickovou arterií a pupečnickovou vénou ve vztahu k možnosti náběru směsné pupečnickové krve v další diagnostice změn steroidogenezy

Přes významné arteriovenózní difference u řady steroidů (Tab. 1), téměř všechny volné steroidy a zejména jejich polární konjugáty silně korelují mezi UA a UV (Obr. 9 a 10, Tab. 4), což naznačuje srovnatelnou výpovědní hodnotu krví z UA, UV a smíšené pupečnickové krve.

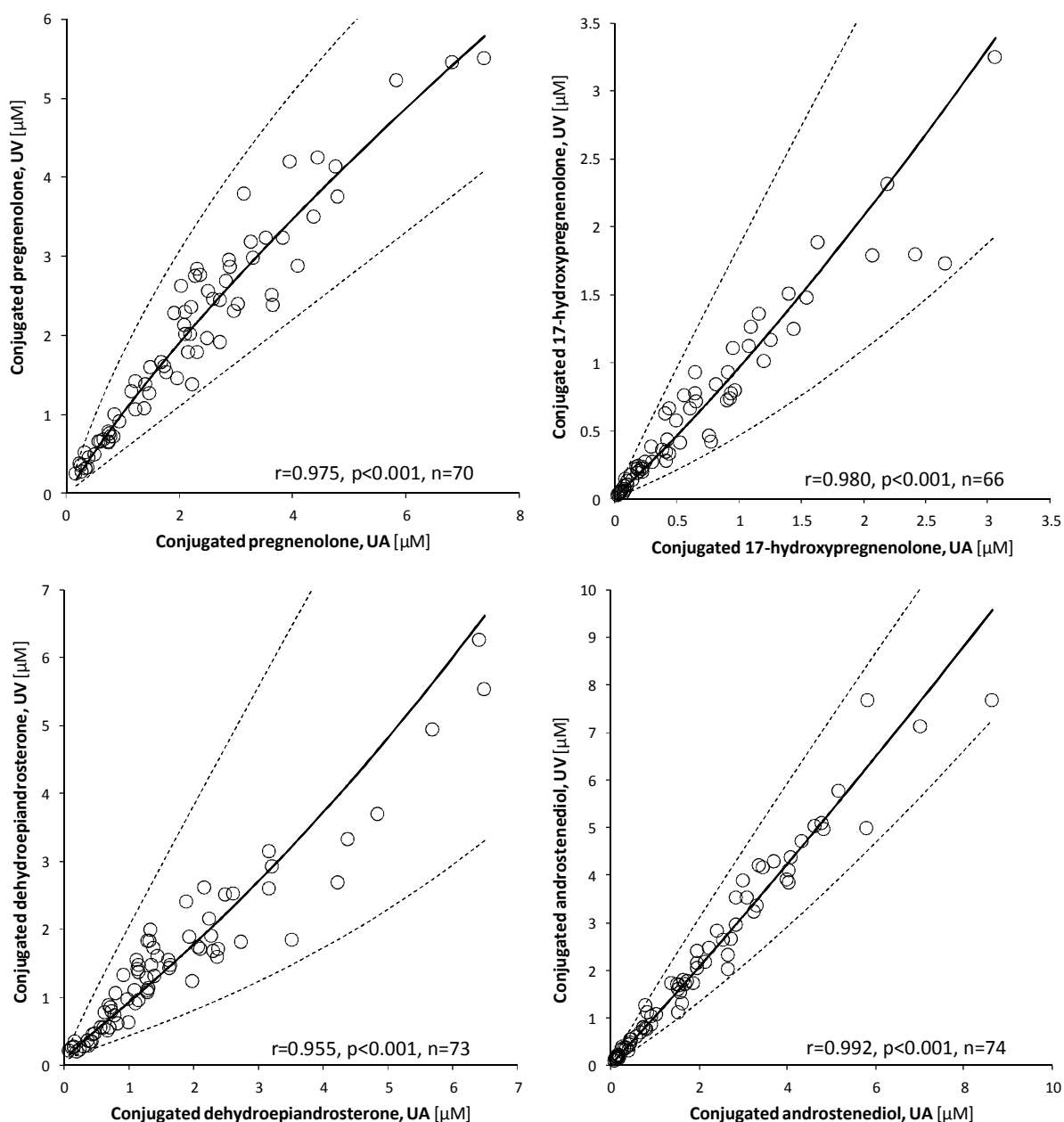
Tabulka 4. Korelace mezi steroidy v krvi z pupečnickové artérie a v krvi z pupečnickové vény u předčasných porodů a porodů v termínu.

Steroid	Nekonjugované steroidy			Steroidní polární konjugáty			Δr p
	r	p	n	r	p	n	
Pregnenolon	0.689	<0.001	76	0.975	<0.001	70	<0.001
17-Hydroxypregnenolon	0.711	<0.001	79	0.980	<0.001	66	<0.001
20 α -Dihydropregnenolon	0.781	<0.001	74	0.982	<0.001	69	<0.001
16 α -Hydroxypregnenolon	0.851	<0.001	74	0.669	<0.001	75	0.007
Dehydroepiandrosteron	0.770	<0.001	75	0.954	<0.001	72	<0.001
16 α -Hydroxy-DHEA	0.846	<0.001	77	0.423	<0.001	76	<0.001
7 α -Hydroxy-DHEA	0.474	<0.001	79	-----	-----	-----	-----
7 β -Hydroxy-DHEA	0.652	<0.001	76	-----	-----	-----	-----
Androstendiol	0.502	<0.001	79	0.992	<0.001	74	<0.001
5-Androsten-3 β ,7 α ,17 β -triol	0.422	<0.001	78	0.818	<0.001	73	<0.001
5-Androsten-3 β ,7 β ,17 β -triol	0.411	<0.001	75	0.930	<0.001	73	<0.001
Progesteron	0.593	<0.001	75	-----	-----	-----	-----
17-Hydroxyprogesteron	0.865	<0.001	46	0.914	<0.001	30	0.332
20 α -Dihydroprogesteron	0.853	<0.001	75	0.875	<0.001	71	0.607
16 α -Hydroxyprogesteron	0.924	<0.001	78	-----	-----	-----	-----
Estron	0.912	<0.001	75	0.931	<0.001	73	0.451
16 α -Hydroxyestron	0.740	<0.001	52	-----	-----	-----	-----
Estradiol	0.895	<0.001	73	0.870	<0.001	74	0.501
Estriol	0.809	<0.001	77	0.929	<0.001	73	0.002
Androstendion	0.831	<0.001	73	-----	-----	-----	-----
16 α -Hydroxyandrostendion	0.833	<0.001	76	-----	-----	-----	-----
Testosteron	0.668	<0.001	77	-----	-----	-----	-----
16 α -Hydroxytestosteron	0.794	<0.001	78	-----	-----	-----	-----
5 α -Dihydroprogesteron	0.776	<0.001	76	-----	-----	-----	-----
Androsteron	0.501	<0.001	76	0.914	<0.001	73	<0.001
Epiandrosteron	-----	-----	-----	0.884	<0.001	74	-----
Etiocholanolon	0.379	<0.001	77	0.930	<0.001	72	<0.001
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol	-----	-----	-----	0.970	<0.001	74	-----
5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol	-----	-----	-----	0.909	<0.001	73	-----
5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol	-----	-----	-----	0.874	<0.001	73	-----
Allopregnanolon	0.704	<0.001	74	0.982	<0.001	74	<0.001
Isopregnanolon	0.803	<0.001	76	0.978	<0.001	75	<0.001
5 β -Dihydroprogesteron	0.847	<0.001	74	-----	-----	-----	-----
Pregnanolon	0.733	<0.001	77	0.966	<0.001	74	<0.001
Epipregnanolon	0.755	<0.001	78	0.931	<0.001	72	<0.001
5 α ,20 α -Tetrahydroprogesteron	0.781	<0.001	75	0.892	<0.001	72	0.023
5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0.542	<0.001	75	0.987	<0.001	74	<0.001
5 α -Pregnan-3 β ,20 α -diol	0.872	<0.001	77	0.982	<0.001	73	<0.001
5 β ,20 α -Tetrahydroprogesteron	0.936	<0.001	74	0.864	<0.001	71	0.020
5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol	0.866	<0.001	75	0.974	<0.001	65	<0.001
5 β -Pregnan-3 β ,20 α -diol	0.737	<0.001	73	0.974	<0.001	73	<0.001

r = Párové korelační koeficienty po mocninné transformaci původních dat směrem k symetrii a konstantnímu rozptylu, p = hladina významnosti, n = počet subjektů; Δr = difference mezi korelačními koeficienty pro nekonjugované a konjugované steroidy



Obr. 9. Korelace nekonjugovaných Δ^5 steroidů mezi UA a UV při porodu. Plné křivky označují retransformovanou hlavní osu, zatímco čárkované křivky představují retransformovaný 95% konfidenční elipsoid z dat upravených mocninnou transformací směrem k symetrii a konstantnímu rozptylu; r , p , and n představují korelační koeficienty, jejich statistickou významnost a počet měření. UA = pupečnicková arterie, UV = pupečnicková vena.



Obr. 10. Korelace konjugovaných Δ^5 steroidů mezi UA a UV při porodu. Plné křivky označují retransformovanou hlavní osu, zatímco čárkované křivky představují retransformovaný 95% konfidenční elipsoid z dat upravených mocninnou transformací směrem k symetrii a konstantnímu rozptylu; r , p , and n představují korelační koeficienty, jejich statistickou významnost a počet měření. UA = pupečnicková arterie, UV = pupečnicková vena.

VII. DISKUSE

VII.1 Odhad gestačního věku z hladin steroidů

Jak ukazují Tab. 5 a Obr. 11, většina měřených steroidů korelovala kladně s gestačním věkem při porodu. Vzhledem k tomu, že u žen zahrnutých ve studii nebyla příčina předčasného porodu spojena s nerovnováhou ve hladinách steroidů, dalo se předpokládat, že steroidní metabolom odrážel především GA či zralost plodu a sestavený matematický model by mohl být užitečný pro odhad fetální zralosti a termínu porodu. Na druhé straně je jasné, že tento model nepostihuje neočekávané komplikace v těhotenství, které často vedou k předčasnému porodu. Model tedy vyhovoval situacím, kdy termín porodu byl závislý na hormonálních změnách a umožňoval zjištění nejlepších prediktorů tohoto termínu.

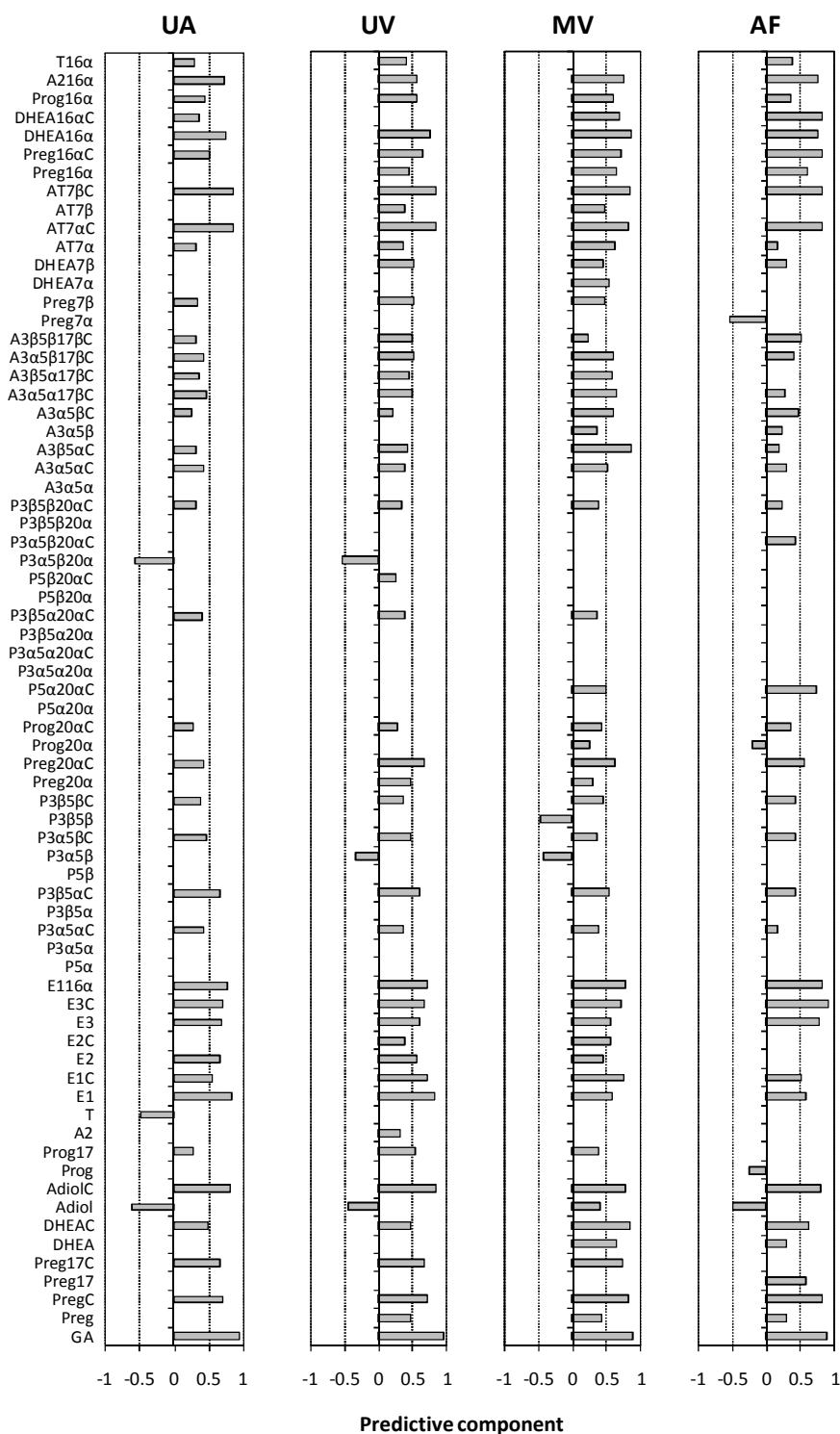
Výše uvedená studie také poskytla odpověď na otázku, zdali je steroidní metabolom v mateřské plazmě z hlediska predikce termínu porodu srovnatelný se steroidním metabolomem v tělních tekutinách plodu. Bylo zjištěno, že prediktivita steroidů v krvi matky (dosažitelné s podstatně nižší invazivitou ve srovnání s tělními tekutinami plodu, jejichž získání v průběhu gestace s sebou nese jisté riziko pro plod) dosahuje lepších hodnot než prediktivita steroidů v plodové vodě a jen o málo nižších hodnot ve srovnání s krví z UA a UV (Obr. 12).

Nejprve byly do modelu zahrnuty všechny měřené steroidy a v dalším kroku byly steroidy, jejichž komponentní váhy vyjádřené jako korelace se společnou prediktivní komponentou nedosahovaly statistické významnosti, vyloučeny z modelu, neboť zvyšovaly podíl nevysvětlené variability. Steroidy, jejichž korelace se společnou prediktivní hodnotou se blížily -1 nebo 1, silně negativně nebo pozitivně korelovaly s prediktivní komponentou, byly dobrými prediktory pro odhad gestačního věku. Parametry modelu byly nastaveny tak, aby bylo dosaženo maximálního podílu vysvětlené variability u závisle proměnné GA nezávisle proměnnými. Komponentní váhy (Obr. 11) podle našeho očekávání ukazovaly, že Δ^5 steroidy, které jsou klíčovými produkty FZ (aktivita FZ je stimulována placentárním CRH), jsou účinnými prediktory GA, podobně jako většina volných a konjugovaných estrogenů, které jsou produkty formovanými z fetálních sulfátů C19 Δ^5 steroidů v placentě. Také polární konjugáty (sulfáty a glukuronidy) pregnanolonových izomerů byly poměrně účinnými

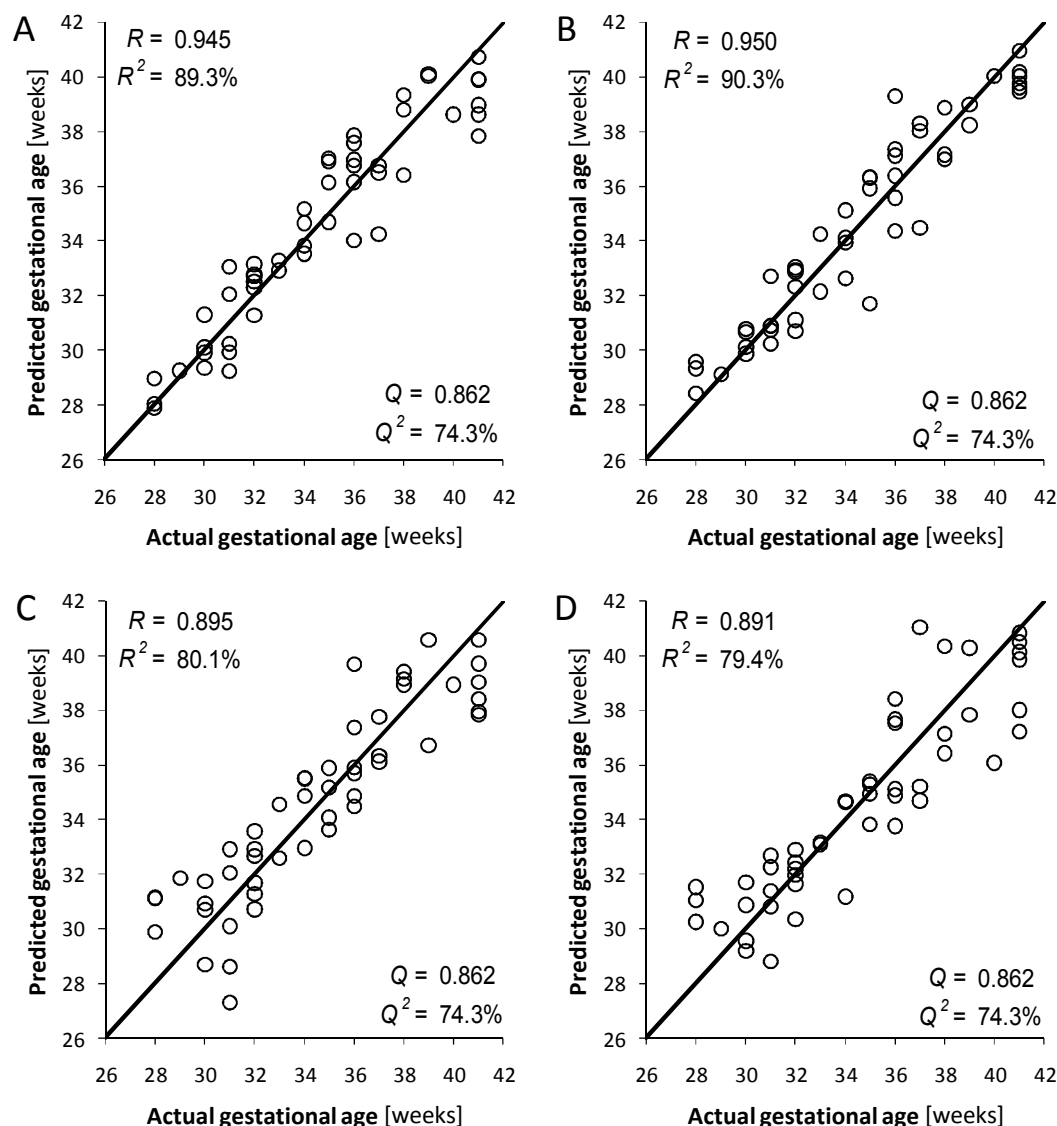
prediktory GA, zatímco jejich volné analogy měly prediktivitu nízkou. Tento výsledek naznačoval rostoucí sulfatační aktivitu steroidů s rostoucím GA, která již byla zaznamenána v naší dřívější studii publikované naší skupinou (Hill et al., 2007). Uvedený nález může mít význam v regulaci účinku některých neuroaktivních steroidů okolo porodu. Také volné 20α -hydroxysteroidy, s výjimkou 20α -dihydropregnenolonu, měly nízkou prediktivitu pro odhad GA, zatímco jejich konjugované analogy ukazovaly prediktivitu poněkud vyšší. Konjugovaný 20α -dihydropregnenolon pozitivně koreloval s GA ve všech sledovaných tělních tekutinách.

Tabulka 5. Zkratky steroidů k Obr. 11 (C na konci zkratky znamená polární konjugáty, většinou sulfáty či glukuronidy)

Zkratka	Steroid
A2	androstendion
A216α	16α-hydroxy-4-androsten-3,17-dion; 16α-hydroxy-androstendion
A3α5α	3α-hydroxy-5α-androstan-17-on; androsteron
A3α5β	3α-hydroxy-5β-androstan-17-on; etiocholanolon
Adiol	5-androsten-3β,17β-diol; androstendiol
AT7α	5-androsten-3β,7α,17β-triol
AT7β	5-androsten-3β,7β,17β-triol
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEA16α	3β,16α-dihydroxy-5-androsten-17-on; 16α-hydroxy-DHEA
DHEA7α	3β,7α-dihydroxy-5-androsten-17-on; 7α-hydroxy-DHEA
DHEA7β	3β,7β-dihydroxy-5-androsten-17-on; 7β-hydroxy-DHEA
E1	estron
E116α	3,16α-dihydroxy-estr-17-on; 16α-hydroxy-estron
E2	estradiol
E3	estriol
P3α5α	3α-hydroxy-5α-pregnan-20-on; allopregnanolon
P3α5α20α	5α-pregnan-3α,20α-diol
P3α5β	3α-hydroxy-5β-pregnan-20-on; pregnanolon
P3α5β20α	5β-pregnan-3α,20α-diol
P3β5α	3β-hydroxy-5α-pregnan-20-on; isopregnanolon; epiallopregnanolon
P3β5α20α	5α-pregnan-3β,20α-diol
P3β5β	3β-hydroxy-5β-pregnan-20-on; epipregnanolon
P3β5β20α	5β-pregnan-3β,20α-diol
P5α	5α-dihydroprogesteron
P5α20α	20α-hydroxy-5α-pregnan-3-on
P5β	5β-dihydroprogesteron
P5β20α	20α-hydroxy-5β-pregnan-3-on
Preg	pregnenolon
Preg16α	16α-hydroxy-pregnenolon
Preg17	17-hydroxy-pregnenolon
Preg20α	5-pregnen-3β,20α-diol; 20α-hydroxy-pregnenolon
Preg7α	3β,7α-dihydroxy-5-pregnen-17-on; 7α-hydroxy-DHEA
Preg7β	3β,7β-dihydroxy-5-pregnen-17-on; 7β-hydroxy-DHEA
Prog	progesteron
Prog16α	16α-hydroxy-4-pregnen-3,20-dion; 16α-hydroxy-progesteron
Prog17	17-hydroxy-progesteron
Prog20α	20α-hydroxy-4-pregnen-3-on; 20α-dihydroprogesteron
T	testosteron
T16α	16α,17β,-dihydroxy-4-androsten-3-on; 16α-hydroxy-testosteron



Obr 11. Korelace steroidních hladin a GA se společnou prediktivní komponentou. Konečný model OPLS (ortogonální projekce do latentní struktury) je vyjádřen jako sloupcový graf znázorňující statisticky významné komponentní váhy ve formě korelačních koeficientů se společnou prediktivní komponentou pro GA a hladiny steroidů. Chybějící sloupce symbolizují nevýznamnost ($p > 0,05$) hladin příslušných steroidů v původním modelu OPLS zahrnujícím všechny měřené ($n = 69$) steroidy.



Obr 12. Porovnání predictivity modelu OPLS v predikci gestačního věku z hladin steroidů v pupečnickové artérii (UA), pupečnickové vlně (UV), mateřské kubitální vlně (MV) a v plodové vodě (AF); R^2 je procento z celkového rozptylu dat ve vektoru závisle proměnné Y (gestační věk) vysvětlené modelem OPLS. R^2 nebo R je míra shody mezi predikcemi a skutečnými hodnotami gestačního věku. R^2 blízké hodnotě 1 je nezbytnou podmínkou dobrého modelu; Q^2 je obdobou R^2 po cross-validaci. Q^2 ukazuje, jak by model predikoval nová data. $Q^2 > 0,5$ ukazuje dobrou prediktivitu.

VII.2 Enzymy steroidogenezy v těhotenství

Dosavadní převládající názor považující mateřský LDL cholesterol za jediný substrát pro placentární syntézu mateřského progesteronu totiž nevysvětluje zhruba trojnásobně vyšší hladiny progesteronu u plodu proti hladinám v mateřské krvi. Zaměřili jsme se proto na úlohu FZ v tvorbě prekursorů pro tvorbu progesteronu v lidském těhotenství, neboť FZ, která je stimulována rostoucí produkcí placentárního CRH produkuje sulfáty Δ^5 steroidů, jako jsou pregnenolonsulfát či DHEAS, které jsou díky výtečné rozpustnosti snadno transportovány z FZ do placenty k další konverzi na gestageny a estrogeny. Zatímco význam DHEAS pro placentární syntézu estrogenů je dnes již obecně přijímán, otázkou zůstává, k čemu slouží specificky těhotenská nadprodukce pregnenolonsulfátu ve FZ. Podle hypotézy našeho týmu, je místo nezbytnosti syntetizovat de novo veškerý mateřský progesteron výhodnější využít nadprodukci fetálního pregnenolonsulfátu, neboť aktivity steroidní sulfatázy (STS) a HSD3B1 jsou podstatně vyšší, než aktivita CYP11A1, která je rychlost limitujícím krokem v placentární tvorbě progesteronu z LDL cholesterolu. V literatuře popsaná relativní nezávislost hladin progesteronu na aktivitě FZ může být důsledkem saturace enzymů konvertujících pregnenolonsulfát na progesteron substrátem. Podobně jako data z literatury, ani naše data neukazovala korelaci mezi mateřským a fetálním progesteronem. Nicméně naše data ukazovala významné parciální korelace mezi mateřským a fetálním 20α -dihydroprogesteronem a mezi 20α -dihydroprogesteronem a progesteronem v krvi matky (Tab. 6). Tyto výsledky spolu s literárními daty ukazují, že lokalizace izoforem HSD17B zajišťuje vyšší podíl estronu a progesteronu v plodu, ale vyšší podíl 20α -dihydroprogesteronu a estradiolu u matky. HSD17B2 oxidující estradiol na estron a 20α -dihydroprogesteron na progesteron je vysoce exprimována v placentárních endoteliálních buňkách, které jsou ve styku s fetálním kompartmentem. Naopak, syncytium, které je v kontaktu s kompartmentem mateřským, produkuje značná množství 20α -dihydroprogesteronu a estradiolu působením zejména HSD17B1 ale patrně i HSD17B7 a AKR1C3.

Tabulka 6. Párové a parciální korelace (adjustované na konstantní koncentrace všech steroidů v korelační matici mimo sledovaný pár) v séru z pupečnickové vény (UV) a mateřské kubitální vény (MV) pro progesteron (Prog), 20 α -dihydroprogesteron (Prog20 α) a jeho polární konjugáty (Prog20 α C);

			UV			MV			
			Prog	Prog20α	Prog20αC	Prog	Prog20α	Prog20αC	
UV	Prog	r		0.277	0.196	0.083	0.103	0.188	PÁROVÉ KORELACE
		n		46	46	46	46	46	
		p		0.063	0.192	0.582	0.497	0.210	
	Prog20α	r	0.241		0.569	0.326	0.632	0.527	
		n	46		46	46	46	46	
		p	0.124		0.000	0.027	0.000	0.000	
	Prog20αC	r	0.030	0.254		0.202	0.515	0.747	
		n	46	46		46	46	46	
		p	0.852	0.105		0.178	0.000	0.000	
MV	Prog	r	0.090	-0.124	-0.135		0.680	0.310	
		n	46	46	46		46	46	
		p	0.569	0.433	0.395		0.000	0.036	
	Prog20α	r	-0.156	0.432	0.071	0.647		0.602	
		n	46	46	46	46		46	
		p	0.323	0.004	0.655	0.000		0.000	
	Prog20αC	r	0.072	-0.016	0.597	-0.032	0.283		
		n	46	46	46	46	46		
		p	0.651	0.922	0.000	0.842	0.070		
			PARCIÁLNÍ KORELACE						

r = korelační koeficient, *n* = počet, *p* = hladina významnosti

I další práce publikované v rámci postgraduálního studia se podrobně věnovaly kritickému zhodnocení konceptu o mateřském LDL cholesterolu jako jediném zdroji mateřského progesteronu. Konverze cholesterolu a jeho sulfátu na pregnenolon a jeho sulfát je totiž rychlost limitujícím krokem, na rozdíl od transportu cholesterolu na aktivní místa, který limituje konverzi cholesterol/sulfátu na pregnenolon/sulfát v případě extraplacentárních tkání. Je známo, že aktivity STS a HSD3B1 v placentě jsou enormní ve srovnání s jinými tkáněmi, jsou nezávislé na GA a jsou schopny snadno konvertovat DHEAS na estrogény. Je zajímavé, že osud pregnenolonsulfátu v této souvislosti nebyl uvažován, ačkoliv jeho koncentrace v pozdním těhotenství jsou přinejmenším stejné jako koncentrace DHEAS, což je specifické právě jen v těhotenství, zatímco mimo těhotenství jsou koncentrace

pregnenolonsulfátu více než o řád nižší proti koncentracím DHEAS. Není tedy důvod, aby nebyl pregnenolonsulfát konvertován na progesteron stejným způsobem, jako je DHEAS konvertován na androstendion (a ten, na rozdíl od progesteronu, dále aromatizován na estron). Je tedy patrně výhodnější využít dostupného pregnenolonsulfátu místo syntézy veškerého progesteronu z LDL cholesterolu de novo. Vzhledem k tomu, že progesteron je kritický pro udržení gestace, je pravděpodobné, že existují přinejmenším dva nezávislé mechanismy jeho syntézy. Zatímco syntéza z mateřského cholesterolu je prvním z nich, není důvod, aby placenta odmítala zpracovávat pregnenolonsulfát podobně jako DHEAS (samozřejmě vyjma aromatizace). Data rovněž naznačují, že vzrůst produkce Δ^5 steroidů s rostoucím GA je spojen se vzrůstem hladin progesteronu v UV, ne však v ostatních tělních tekutinách matky a plodu, což ukazuje, že primárně placentární a patrně i jaterní oxidoreduktázy mohou interkonvertovat Prog a Prog20 α a naopak, což v případě placenty znamená, že distribuce izoform placentárních oxidoreduktáz je určující pro převážně oxidativní status steroidů v UV (na výstupu z placenty do plodu) a jejich převážně reduktivní status v mateřské krvi. Výsledky rovněž dokazují, že tento mechanismus se netýká jen progesteronu, ale rovněž estrogenů, redukovaných androstanových metabolitů a neuroaktivních progesteronových metabolitů (Obr. 3–7). Výsledky ukazují, že UV obsahuje vyšší podíl 20-oxo-steroidů, jako jsou progesteron, 17-oxo steroidy (např. estron a dehydroepiandrosteron), 3-oxo-steroidy, jako jsou 5 α / β -dihydroprogesterony, a 3 β -hydroxy-steroidy (isopregnanolon and epipregnanolon), zatímco v krvi matky je větší podíl 20 α -hydroxy-steroidů, jako jsou 20 α -dihydroprogesteron, 17 β -hydroxy-steroidy, jako jsou estradiol a androstendiol, a 3 α -hydroxy-steroidů, jako např. neuroinhibiční allopregnanolon a pregnanolon (Obr. 13). Také hladiny konjugovaných 3 α -hydroxy-5 α / β -redukovaných C-19 steroidů v MV jsou podstatně vyšší než ve fetální cirkulaci či v plodové vodě, zatímco 3 β -isomer konjugovaný epiandrosteron, který je produktem oxidativních izoform HSD17B, nevykazuje rozdíl mezi matkou a plodem.

Naší skupinou navržený mechanismus zajišťuje následující funkce: 1) zajištění substrátů pro produkci progesteronu a syntézu neuroprotektivních steroidů v plodu, 2) tvorbu hormonálního prostředí umožňujícího kontrolu nástupu porodu.

VII.3. Vývoj steroidogenezy v posledním trimestru těhotenství s ohledem na stabilitu těhotenství

VII.3.1 Poměry steroidních hormonů k aktivitě 17-hydroxylázy, C17, 20-lyáz a dehydrogenáz 3 β -hydroxysteroidů (CYP17A1)

Ve vztahu k CYP17A1 a GA nebyl pozorován žádný konzistentní obecný trend (Tab. 2). Tato nejednoznačná data jsou pravděpodobně spojena s komplexní povahou steroidního fetálního metabolomu a čelní pozicí CYP17A1 v metabolismu steroidů.

VII.3.2 Poměry steroidů ve vztahu k aktivitě dehydrogenáz 3 β -hydroxysteroidů (HSD3Bs)

Specifická placentální 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenáza/ $\Delta^{(5\rightarrow4)}$ -isomeráza typu 1 (HSD3B1) nevykazovaly významný vztah ke GA, což je v souladu s literaturou (Hill et al., 2010a). Naše současná data jsou v celkové shodě s daty publikovanými skupinou Ishida et. al. (Ishida et al., 1985). Poměry steroidů vztažené k aktivitě HSD3B buď nedosahují významné závislosti na GA, nebo pozitivně korelují s GA (Tab. 2). Pozitivní korelaci s GA lze vysvětlit vzrůstající aktivitou 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy/ $\Delta^{(5\rightarrow4)}$ -isomerázy typu 2 (HSD3B2) během zrání fetální nadledviny při konstantní placentální aktivitě HSD3B1 v průběhu tohoto období. Oba enzymy HSD3B však katalyzují oxidativní konverzi Δ^5 steroidů na Δ^4 steroidy, tj. na progesteron a 17-hydroxyprogesteron v případě C21 Δ^5 steroidů, zatímco C19 Δ^4 steroidy jsou prekurzory estrogenů. Podle údajů v literatuře nebyla imunoreaktivita enzymů HSD3B detekována ve fetální nadledvině před 22. týdnem gestace, ale po 23. týdnu se aktivita HSD3B2 objevuje v TZ a FZ (Hill et al., 2010a). Aktivita enzymů HSD3B může být diagnosticky využitelná. Maruyama et al. zjistili nízké poměry Δ^4/Δ^5 steroidů v mateřské krvi naznačující nedostatečnou aktivitu HSD3B2 při těhotenstvích s intrauterinní retardací růstu (IUGR) (Maruyama et al., 1986).

VII.3.3 Poměry mezi steroidními hormony ve vztahu k aktivitě aromatázy (CYP19A1)

Naše současné výsledky demonstrují významně a konzistentně rostoucí hodnoty steroidních poměrů ve vztahu k aktivitě aromatázy CYP19A1 (estron/androstendion, estradiol/testosteron) a s významně vyššími hodnotami těchto poměrů v UV než v UA. Tato data ukazují na jednoznačně rostoucí placentální aktivitu CYP19A1 se zvyšujícím se GA (Tab. 2). Tato aktivita však pravděpodobně klesá před termínem porodu, jak je doloženo absencí významných rozdílů mezi skupinou B a skupinou C. Uvedené výsledky jsou v souladu s literárními daty (Hill et al., 2010a). CRH totiž stimuluje biosyntézu estrogenů v lidském placentárním trofoblastu.

Zatímco dospělá játra vykazují nízkou aktivitu CYP19A1, fetální játra extenzivně aromatizují různé C-19 steroidy na estrogény. Aktivita CYP19A1 ve fetálních hepatocytech je nejspíše dále stimulována nárůstem tvorby glukokortikoidů v TZ s rostoucím GA (Hill et al., 2010a).

Klesající koncentrace androstendiolu a testosteronu v době nástupu porodu (na rozdíl od hladin androstendionu, které se s GA zvyšují) jsou pravděpodobně spojeny s jejich úlohou jako klíčových substrátů pro tvorbu estrogenů a se vzrůstající aktivitou CYP19A1 během těhotenství. Tato data ukazují na hlavní metabolickou dráhu syntézy placentálního estradiolu: konjugovaný androstendiol → androstendiol → testosteron → estradiol, která je kratší než dráha DHEAS → DHEA → androstendion → estron → estradiol. Navíc, na rozdíl od DHEAS, jehož koncentrace jsou jen těžko srovnatelné u těhotných a netěhotných žen, jsou koncentrace konjugovaného androstendiolu u těhotných žen extrémně zvýšené a vykazují zrychlující se vzestup až do 36.–37. týdne gestace (Hill et al., 2010a).

VII.3.4 Poměry steroidních hormonů ve vztahu k aktivitě 16 α -hydroxylázy (CYP3A7)

16 α -Hydroxylace je katalyzována cytochrom P450 dependentním enzymem 16 α -hydroxylázou (CYP3A7), který je specificky exprimován v mikrosomální frakci fetálních/neonatálních jater, zatímco jeho aktivita v dospělých játrech je zanedbatelná. Fetální CYP3A7 katalyzuje kromě syntézy 16 α -hydroxysteroidů i syntézu a 7 β -hydroxy-DHEA.

V případě 16 α -hydroxyprogesteronu byla však v literatuře v minulosti naznačována i participace placentálního CYP17A1 na jeho syntéze. Kromě fetálních jater je CYP3A7 aktivní ještě ve fetální nadledvině, kde vykazuje přibližně jednu třetinu aktivity ve srovnání s fetálními játry (Hill et al., 2010a).

Naše současná data ukazují, že kromě poměrů 16 α -hydroxypregnenolonu/pregnenolonu, 16 α -hydroxyestronu/estronu a estriolu/estradiolu (jež jsou nezávislé na GA) zbývající poměry odrážející aktivity CYP3A7 s narůstajícím GA významně stoupají (Tab. 2). Navíc i většina hladin 16 α -hydroxysteroidů významně narůstá se vzrůstajícím GA (Tab. 1). To ukazuje souběžný vzestupem CYP19A1 v placentě a CYP3A7 ve fetálních játrech.

Je pravděpodobné, že rostoucí aktivita enzymu CYP3A7 chrání 16 α -hydroxylací prekurzorů i vlastních estrogenů plod proti hyperestrogenizaci. Ačkoli jsou vysoké hladiny aktivních estrogenů v mateřském kompartmentu blízko termínu porodu potřebné pro spuštění porodu, plod v tomto období pravděpodobně úspěšně odolává hyperestrogenizaci díky aktivaci aktivity jaterního CYP3A7 a oxidativních izoform HSD17B a AKR1C umožňujících konverzi aktivního estradiolu na inaktivní estron a sulfatací a glukuronidací estrogenů ve fetálních játrech. Někteří autoři včetně nás ukazují, že hladiny 16 α -hydroxysteroidů ve fetální krvi od druhého do třetího trimestru těhotenství stoupají a že dále stoupají i při porodu. Poměry 16 α -hydroxy-metabolitů k 16-deoxy-steroidům navíc po 30. týdnu gestace také vykazují významně vzestupný trend, což ukazuje na rostoucí katabolismus prekurzorů pohlavních hormonů ve fetálních játrech (Hill et al., 2010a).

Vzhledem k tomu, že 16 α -hydroxylace je v těhotenství omezena na fetální játra a fetální nadledvinu, je v UA podle očekávání vyšší poměr 16 α -hydroxypregnenolonu/pregnenolonu. Poměr 16 α -hydroxyprogesteronu/progesteronu však nevykazuje rozdíl mezi UA a UV a v případě C 19 steroidů jsou dokonce vyšší poměry v UV. Nicméně nejen tyto poměry, ale také hladiny DHEA16 α a DHEA16 α C jsou v UV vyšší než v UA (Tab. 3), což může být vysvětleno schopností placenty přednostně zpracovávat 16-deoxysteroidy před 16 α -hydroxy-steroidy, které mohou být ve většině případů přestupovat zpět do fetálního kompartmentu bez další konverze. Toto vysvětlení je také v souladu s daty publikovanými jinými autory, kteří dokazují, že 16 α -hydroxymetabolity C19 steroidů jsou jen slabými substráty pro placentální aromatázu v porovnání s odpovídajícími 16-deoxysteroidy

(Cantineau et al., 1982) a že iniciální poměry tvorby estrogenů jsou vyšší pro C19 16-deoxy-steroidy (Othman a Oakey, 1996).

VII.3.5 Poměry steroidních hormonů ve vztahu k aktivitě 5 α -reduktázy (SRD5A)

Poměry steroidů ve vztahu k aktivitě enzymů skupiny SRD5A ve fetálním kompartmentu nezávisely na GA (5 α -dihydroprogesteron/progesteron, 5 α ,20 α -tetrahydroprogesteron/20 α -dihydroprogesteron) (Tab. 2). Poměr 5 α -dihydroprogesteronu/progesteronu byl statisticky významně nižší v UV, ale poměr 5 α ,20 α -tetrahydroprogesteronu/20 α -dihydroprogesteronu byl v UV sice mírně, ale statisticky významně vyšší, pravděpodobně díky přednostní konverzi 20 α -dihydroprogesteronu na progesteron před konverzí 5 α -dihydroprogesteronu a 5 α ,20 α -tetrahydroprogesteronu pomocí oxidačních enzymů HSD17B a AKR1C. Nižší hodnoty poměru 5 α -dihydroprogesteron/progesteron v UV proto ukazují na fetální játra (nikoli placentu) jako klíčový zdroj přinejmenším fetálních 5 α -redukováných metabolitů progesteronu. Tyto výsledky naznačují nezávislost celkové aktivity SRD5A na GA ve třetím trimestru.

V periferních tkáních včetně jater SRD5A1 a redukční izoformy enzymů HSD17B a AKR1C eliminují aktivní androgeny a chrání organismus před hormonálními výkyvy (Jin a Penning, 2001). 5 α -Redukované steroidy včetně allopregnanolonu tlumí nervovou aktivitu a pravděpodobně mají neuroprotektivní účinky v CNS plodu (Yawno et al., 2009). Placentální exprese obou izoform stoupá s pokračujícím těhotenstvím. Placentární a mozkové 5 α -reduktázy pravděpodobně také poskytují prekursor pro syntézu allopregnanolonu ve fetálním CNS (Vu et al., 2009).

VII.3.6 Poměry steroidních hormonů ve vztahu k aktivitě 5 β -reduktázy (AKR1D1)

5 β -Reduktáza (AKR1D1) je primárně exprimována v játrech, ale určitá aktivita tohoto enzymu byla detekována také v dalších tkáních včetně placenty. Poměry steroidních hormonů vztahované k aktivitě AKR1D1 (5 β -dihydroprogesteron/progesteron, 5 β ,20 α -

-tetrahydroprogesteron/progesteron) pozvolna klesají s narůstajícím GA (Tab. 2). Navíc i většina 5 β -redukovaných metabolitů progesteronu statisticky významně klesá s narůstajícím GA (Tab. 1). Výsledky získané v rámci studie jsou tedy podle očekávání v souladu s literárními daty (Hill et al., 2010a) i s našimi předchozími studiemi (Hill et al., 2010ab; Hill et al., 2007) ukazujícími zeslabování aktivity AKR1D1 s nástupem porodu.

Uvedená zjištění mohou být důležitá z hlediska stability těhotenství a spuštění porodu, neboť metabolit progesteronu 5 β -dihydroprogesteron je silně tokolytický. 5 β -Redukované metabolity progesteronu pravděpodobně působí během těhotenství chronicky, přes nukleární pregnanové receptory typu X (PXR) (Hill et al., 2010a) i skrze vazbu na nukleární progesteronové receptory (Putnam et al., 1991). Nicméně, akutní působení 5 β -dihydroprogesteronu in vitro vede k rychlé relaxaci děložní tkáně, která není zprostředkována nukleárními receptory (Hill et al., 2010a).

V placentě klesá relativní exprese enzymu AKR1D1 v souvislosti s porodem přibližně dvojnásobně zatímco v myometriu přibližně desetinásobně. Naše současná data jsou v souladu s předpokládanou úlohou 5 β -dihydroprogesteronu při nástupu spontánního porodu u člověka (Hill et al., 2010a).

V UV jsou nižší hodnoty poměru 5 β -dihydroprogesteron/progesteron, zatímco poměr 5 β ,20 α -tetrahydroprogesteronu/20 α -dihydroprogesteronu je v UV lehce, ale statisticky významně vyšší. Vysvětlení pro druhý nálezn může být analogické jako pro vyšší poměr 5 α ,20 α -tetrahydroprogesteronu/20 α -dihydroprogesteronu v UA. Nižší hodnoty poměru 5 β -dihydroprogesteronu/progesteronu v UV ukazují na fetální játra jako tkáň primárně tvořící přinejmenším fetální 5 β -redukované metabolity progesteronu ale velmi pravděpodobně také mateřské metabolity.

Byrns et al. se domnívají, že inhibice substrátem u AKR1D1 Δ^4 steroidy a estrogeny může přispívat i k indukci porodu estrogeny (Byrns, 2011). Tato inhibice pravděpodobně nastává díky vazbě na specifické vazebné místo AKR1D1. Je pravděpodobné, že i steroidy, které nejsou substráty AKR1D1, včetně estrogenů, mohou inhibovat tento enzym (Byrns, 2011). Hladiny androstendionu jsou během těhotenství jen mírně zvýšeny, avšak hladiny jeho aromatizovaného produktu estronu jsou během těhotenství i porodu velmi vysoké (Hill et al., 2010a) (Tab. 1).

VII.3.7 Poměry steroidních hormonů ve vztahu k aktivitě pluripotentních izoform enzymů ze skupiny 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáz (HSD17B) a rodiny 1 aldoketoreduktáz skupiny C (AKR1C)

Enzymy HSD, reverzibilně katalyzující C-3, C-17 a C-20 oxidoredukční interkonverze, náleží k dehydrogenázám/reduktázám s krátkým řetězcem (HSD1B) nebo k rodině 1 skupiny C aldoketoreduktáz (AKR1C). Různé izoformy výše uvedených enzymů preferují buď oxidační, nebo redukční dráhu jsou široce, ale rozdílně exprimovány v placentě a fetálních tkáních, jako jsou nadledviny, játra, ledviny, plíce a mozek (Hill et al., 2010a).

Poměry steroidních hormonů vztažených k aktivitě pluripotentních enzymů HSD17B a AKR1C, obvykle klesají s nárůstem GA. Poměry 3 α -hydroxysteroidy/3-oxo-steroidy a 3 α -hydroxysteroidy/3 β -hydroxysteroidy, 17 β -hydroxysteroidy/17-oxo-steroidy a 20 α -hydroxysteroidy/20-oxo-steroidy, vykazují jednoznačně rostoucí trend (Tab. 3). Tento trend slábne v pořadí C17, C3 a C20-hydroxy/-oxo steroidy. Uvedené zjištění má pravděpodobně velký fyziologický a patofyziologický význam, protože konverze ketonů na hydroxylovou skupinu je rozhodující pro bioaktivitu několika důležitých steroidních hormonů, jako jsou estrogeny, GABA-ergní steroidy i další neuroaktivní steroidy a gestageny.

Výsledky získané v této práci ukazují, že v plodu je s narůstajícím GA tendence k větší produkci aktivního gestagenu, ale nižší produkce aktivního estrogenu a aktivních GABA-ergních steroidů. Na druhé straně však poměry porod indukujících estrogenů k těhotenství k těhotenství udržujícím gestagenům a GABAergním steroidům přesto vykazují významný vzrůst s rostoucím GA v UV, UA i MV (Obr. 13). Je třeba v této souvislosti zdůraznit, že kromě estradiolu by také estriol mohl za předpokladu vysokých koncentrací, které jsou přítomny v těhotenství, působit jako bioaktivní estrogen (Hill et al., 2011b).

Hodnoty poměrů C17, C3 a C20-hydroxy/-oxo steroidy jsou většinou nižší v UV než v UA. Tato tendence je v souladu s naším konceptem preferenční exprese oxidativních placentálních izoform enzymu HSD17B v kontaktu s fetálním kompartmentem a redukčních placentálních izoform enzymů HSD17B a AKR1C v kontaktu s mateřským kompartmentem. Vyšší hodnoty poměrů allopregnanolon/isopregnanolon a 5 α -pregnan-3 β ,20 α -

-diol/isopregnanolon v UV mohou být výsledkem hlavní aktivity oxidačních izoform HSD17B ve fetálních játrech, která jsou schopna konvertovat nejen 3α -hydroxylové skupiny a 20α -hydroxylové skupiny na odpovídající ketony, ale také 3-oxo skupiny na 3β -hydroxylové skupiny. Vyšší hladiny isopregnanolonu v UA ve srovnání s UV také podporuje tuto interpretaci.

VII.3.8 Rovnováha mezi konjugovanými a nekonjugovanými steroidy

Poměry steroidních polárních konjugátů k nekonjugovaným steroidům (C/U) odrážející především rovnováhu mezi aktivitou steroidních sulfotransferáz a aktivitou steroidních sulfatáz a glukuronidáz jsou uvedeny v Tabulce 3. C/U ukazuje u většiny steroidů vzrůstající trend a některé další steroidní hormony, jako je 17-hydroxyprogesteron v UA, estriol a skupina 5α -redukovaných steroidních hormonů progesteronu, vykazují maximální hodnoty (C/U) ve skupině B. Tato data dokumentují vzrůstající aktivitu steroidních sulfatáz a možná také glukuronidáz s postupujícím GA a (Tab. 3) jsou v souladu s našimi dříve publikovanými daty, ale jsou v rozporu s některými jinými studiemi (Hill et al., 2010a).

Pacifici demonstruje nezávislost GA pro klíčovou izoformu sulfotransferázy, 2A1 hydroxysteroid-sulfotransferázu (SULT2A1) (Pacifici, 2005). SULT2A je ve velké míře exprimována v kortexu nadledviny a v játrech. SULT2A je aktivní ve vztahu k $3\alpha/\beta$ -hydroxysteroidům, estrogenům i k 17β -hydroxy-skupině androgenů (Hill et al., 2010a). Další autoři dokumentují nezávislost placentální STS na koncentraci substrátu a GA. Expres placentální STS v těhotenství je nesrovnatelně vyšší ve srovnání s expresí tohoto enzymu v ostatních tkáních (Hill et al., 2010a).

Na rozdíl od většiny steroidních hormonů vykazuje C/U pro 16-deoxyestrogeny (estron a estradiol) a 17-hydroxyprogesteron klesající trend s narůstajícím GA. To lze vysvětlit rozdílně se měnícími aktivitami nadledvinových a jaterních enzymů katalyzujících konjugaci steroidů, jako je specifická, estrogen preferující sulfotransferáza (SULT1E1), katalyzující výhradně sulfataci estrogenu, SULT2A1 katalyzující sulfataci steroidů, cytosolová rodina sulfotransferáz 2B1 (SULT2B1), selektivně katalyzující sulfataci neestrogenních steroidů, a nespecifické steroid-metabolizující glukuronyltransferázy, jako je jaterní UDP

glukuronyltransferáza 2B7 (UGT2B7). Nárůsty C/U s postupujícím GA jsou obecně zřetelnější mezi skupinami A (28. – 32.týden gestace) a B (33. – 37.týden gestace) než mezi skupinami B a C (38.–42.týden gestace).

Rovnováha mezi volnými steroidy a jejich konjugáty je pravděpodobně klíčová pro regulaci biologické aktivity steroidů a zároveň pro udržení těhotenství. $5\alpha/\beta$ -redukováné metabolity s hydroxylem v pozici 3α - pozitivně modulují $GABA_A$ -r. Jejich sulfáty působí opačně a na jiných vazebných místech. Sulfatace pravděpodobně také snižuje koncentraci nekonjugovaných neuroaktivních steroidů, jejichž polarita je výhodnější pro prostup hematoencefalickou bariérou. Na druhé straně je konjugace je nutným předpokladem pro aktivitu $3\alpha/\beta$ -hydroxy- $5\alpha/\beta$ -redukováných metabolitů progesteronu na NMDA-r, které pozitivně modulují konjugované 5α -izomery (neuroexcitační sloučeniny) a negativně konjugované 5β -izomery (neuroinhibiční sloučeniny).

Sulfatace může ve výsledku také ovlivňovat aktivitu a/nebo dostupnost periferně aktivních, těhotenství udržujících steroidů, jako jsou $5\alpha/\beta$ -redukováné pregnany a androstany, ale může také usnadňovat jejich transport krevním oběhem. Nicméně sulfatace spíše posunuje biologickou aktivitu směrem k indukci porodu katabolismem 5β -redukováných steroidů.

Sulfáty steroidů, jmenovitě DHEAS, také stimulují aktivitu fosfolipázy A2 a pravděpodobně se účastní v regulačním mechanismu syntézy prostaglandinů.

C/U jsou většinou vyšší v UV než v UA, jako je tomu u Δ^5 steroidů, $5\alpha/\beta$ -redukováných pregnanových a androstanových steroidů a 20α -dihydroprogesteronu (Tabulka 3). Tento výsledek lze vysvětlit rychlejší placentální konverzí nekonjugovaných steroidů v porovnání s polárními konjugáty steroidů. Na druhou stranu je poměr C/U v UV nižší u pregnenolonu, 17 -hydroxyprogesteronu, estrogenů (estron, estradiol a estriol) a 16α -hydroxy-DHEA. Na rozdíl od nižšího poměru prenenolonsulfát/pregnenolon v UV než v UA je u poměru DHEAS/DHEA situace opačná.

Nicméně jak pregnenolonsulfát, tak DHEAS dosahují vyšších koncentrací v UA než v UV, nepochybně díky jejich společnému vzniku ve FZ. V případě pregnenolonu může být výsledek spojen s rychlejší placentální desulfatací pregnenolonsulfátu, pomalejší konverzí pregnenolonu na progesteron ve srovnání s pomalejší desulfatací DHEAS a rychlejší konverzí DHEA na androstendion a následně estron.

Nižší hodnoty C/U pro estrogeeny v UV jsou pravděpodobně spojeny se specifickou konjugací estrogeneru ve fetálních játrech a s extrémní aviditou konjugátů estrogenů k hydrolýze placentální STS (Hill et al., 2010a). Podobně jsou poměry více konjugovaný 17-hydroxyprogesteron/17-hydroxyprogesteron a konjugovaný 16 α -hydroxy-DHEA/16 α -hydroxy-DHEA nejspíše odrazem primární konjugační kapacity ve fetálním kompartmentu (fetální nadledviny, fetální játra), avšak extrémní avidity k hydrolýze v placentě a nižší afinity k placentální konverzi 17-hydroxyprogesteronu a 16 α -hydroxy-DHEA na další steroidní metabolity.

VII.4 Rozdíly mezi pupečnickovou arterií a pupečnickovou vénou ve vztahu k možnosti náběru směsné pupečnickové krve v další diagnostice změn steroidogenezy

Většina steroidních korelací mezi umbilikální arteriální a venózní krví (Obr. 9 a 10, Tabulka 4) je silná a vykazuje vyšší hodnoty pro konjugované steroidy, což může souviset s vyšší odolností konjugovaných steroidů vůči dalšímu metabolismu. Silný vztah ukazuje na vzájemnou zaměnitelnost hladin steroidů v UA, UV a UM (směsná umbilikální krev) v diagnostice steroidních endokrinopatií novorozenců a v predikci poruch spojených se steroidy a délkou dožití. Z 67 měřených steroidů vykázalo Pearsonův korelační koeficient vyšší než 0,7 celkem 54 (80,6 %) steroidů, vyšší než 0,8 celkem 43 (64,2 %) steroidů a vyšší než 0,9 celkem 24 (35,8 %) měřených steroidů.

VIII. ZÁVĚR

Tato disertační práce se soustředila na profilování steroidů v těhotenství s ohledem na roli bioaktivních steroidů ve fyziologii a patofyziologii lidského těhotenství. Zvláštní důraz byl položen na fyziologickou a patofyziologickou relevanci steroidů ovlivňujících aktivitu centrálního a periferního nervového systému s ohledem na jejich koncentrace ve fetoplacentární jednotce. Hojně fetální steroidy vykazující negenomové účinky, jako jsou pregnenolonsulfát, progesteron, allopregnanolon nebo pregnanolon, mohou hrát důležitou roli ve vývoji gestačního diabetu a nežádoucího programování plodu a mohou mít naopak žádoucí neuroprotektivní účinky v centrálním nervovém systému plodu. V práci je podrobně diskutován fyziologický význam vzrůstající placentární syntézy progesteronu, klesající produkce tokolytických 5 β -pregnanových steroidů a rostoucí aktivita steroidních sulfotransferáz s rostoucím GA ve třetím trimestru těhotenství.

Dále byl na základě získaných výsledků navržen alternativní mechanismus syntézy progesteronu z fetálního pregnenolonsulfátu, který je úzce spojen s distribucí placentárních oxidoreduktáz. U lidského plodu byl nalezen vzrůstající trend směrem ke konverzi na 3-oxo-(3 β -hydroxy-), 17-oxo a 20-oxo-steroidů na účet jejich 3 α -hydroxy-, 17 β -hydroxy- a 20 α -hydroxy- analogů, tj. byla dokázána obecná tendence k vyšší produkci aktivního gestagenu ale k nižší produkci aktivního estrogenu a GABA-ergních steroidů s pokračujícím těhotenstvím.

Byl rovněž navržen antiestrogenní mechanismus u plodu založený na vzrůstající 16 α -hydroxylaci a sulfataci estrogenů i jejich prekursorů ve spolupráci se vzrůstající aktivitou oxidativních izoforem 17 β -hydroxysteroidních dehydrogenáz a aldoketoreduktáz v placentě a fetálních játrech. Tento mechanismus pravděpodobně chrání plod před hyperestrogenizací vyvolanou eskalující placentární aktivitou aromatázy s postupující gestací.

IX. SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE

Naše výsledky přinesly unikátní data steroidního metabolomu v těhotenství. V práci byly systematicky sledovány hladiny steroidů (včetně neuraktivních) v séru pupečnickové krve a v mateřském séru během těhotenství. Změny hladin neuroaktivních steroidů ukázaly význam v prenatální diagnostice ve vztahu k riziku potratu či předčasného porodu. Tato zjištění zároveň otevřela řadu dalších otázek týkajících se této problematiky a směr možného dalšího výzkumu v této oblasti perinatologie. Hlubší znalost mechanismu začátku porodu člověka a schopnost predikce termínu porodu by způsobila významný pokles v perinatální mortalitě a morbiditě.

X. LITERATURA

1. Adkins CE, Pillai GV, Kerby J, Bonnert TP, Haldon C, McKernan RM, Gonzalez JE, Oades K, Whiting PJ, Simpson PB. $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA(A) receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J Biol Chem* 2001, 276: 38934–38939.
2. Ahokas A, Kaukoranta J, Aito M. Effect of oestradiol on postpartum depression. *Psychopharmacology (Berl)* 1999, 146: 108–110.
3. Ahokas A, Kaukoranta J, Wahlbeck K, Aito M. Estrogen deficiency in severe postpartum depression: successful treatment with sublingual physiologic 17 β -estradiol: a preliminary study. *J Clin Psychiatry* 2001, 62(5): 332–336.
4. Asaba H, Hosoya K, Takanaga H, Ohtsuki S, Tamura E, Takizawa T, Terasaki T. Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J Neurochem* 2000, 75: 1907–1916.
5. Backström T, Mattsson B. Correlation of symptoms in pre-menstrual tension to oestrogen and progesterone concentrations in blood plasma. A preliminary study. *Neuropsychobiology*, 1975, 1: 80–6.
6. Backström T, Wahlstrom G, Wahlstrom K, Zhu D, Wang MD. Isoallopregnanolone; an antagonist to the anaesthetic effect of allopregnanolone in male rats. *Eur J Pharmacol* 2005, 512: 15–21.
7. Baulieu EE. Neurosteroids. a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 1998, 23: 963–987.
8. Beckley EH, Finn DA. Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. *Pharmacol Biochem Behav* 2007, 87: 412–419.
9. Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Gee KW, Lan NC. Modulation of human recombinant GABAA receptors by pregnanediols. *Neuropharmacology* 1996, 35: 1223–1231.

10. Biggio G, Cristina Mostallino M, Follesa P, Concas A, Sanna E. GABA(A) receptor function and gene expression during pregnancy and postpartum. *Int Rev Neurobiol* 2009, 85: 73–94.
11. Bixo M, Andersson A, Winbland B, Purdy RH, Backstrom T. Progesterone, 5alpha-pregnane-3,20-dione and 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *Brain Res* 1997, 764: 173–178.
12. Bixo M, Backstrom T, Winbland B, Andersson A. Estradiol and testosterone in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, 55: 297–303.
13. Bloch M, Schmidt PJ, Danaceau M, Murény J, Nieman L, Rubinow DR. Effects of gonadal steroids in women with a history of postpartum depression. *Am J Psychiatry* 2000, 157: 924–930.
14. Brussaard AB, Koksma JJ. Conditional regulation of neurosteroid sensitivity of GABAA receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 1007: 29–36.
15. Byrns MC. Role of aldo-keto reductase enzymes in mediating the timing of parturition. *Front Pharmacol* 2011, 2: 92.
16. Cantineau R, Kremers P, De Graeve J, Gielen JE, Lambotte R. Aromatization of 15 alpha and 16 alpha hydroxylated androgens in the human placental using [1,2-3H]-substrates. *J Steroid Biochem* 1982, 16: 157–63.
17. Carboni E, Wieland S, Lan NC, Gee KW. Anxiolytic properties of endogenously occurring pregnanediols in two rodent models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 1996, 126: 173–178.
18. Carlton SM, Zhou S, Coggeshall RE. Peripheral GABA(A) receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization. *Neuroscience* 1999, 93: 713-722.
19. Clementi MA, Deis RP, Telleria CM. Luteal 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activities in the rat corpus luteum of pseudopregnancy: effect of the deciduoma reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2004, 2: 22.

20. Concas A, Follesa P, Barbaccia ML, Purdy RH, Biggio G. Physiological modulation of GABA(A) receptor plasticity by progesterone metabolites. *Eur J Pharmacol* 1999, 375: 225–35.
21. Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu E. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain, *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78: 4704–7.
22. Corpechot C, Leclerc P, Baulieu EE, Brazeau P. Neurosteroids: regulatory mechanisms in male rat brain during heterosexual exposure. *Steroids* 1985, 45: 229–34.
23. Crossley KJ, Nitsos I, Walker DW, Lawrence AJ, Beart PM, Hirst JJ. Steroid-sensitive GABAA receptors in the fetal sheep brain. *Neuropharmacology* 2003, 45: 461–72.
24. Csapo A. Progesterone block. *Am J Anat* 1956, 98: 273–291.
25. Csapo AI, Knobil E, Van Der Molen HJ, Wiest WG. Peripheral plasma progesterone levels during human pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol* 1971, 110: 630–632.
26. Dehennin L, Lafarge P, Dailly P, Bailloux D, Lafarge JP. Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in post-competition urine of sportsmen: a simple screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996, 687(1): 85–91.
27. Ding YL, Tang LL. Stereological study on syncytial cell of human placenta and determinations of total bile acid in cord blood of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2005, 40: 453–6.
28. Ellis MJ, Livesey JH, Inder WJ, Prickett TC, Reid R. Plasma corticotropin-releasing hormone and unconjugated estriol in human pregnancy: gestational patterns and ability to predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 186: 94-99.
29. Emanuel RL, Robinson BG, Seely EW, Graves SW, Kohane I, Saltzman D, Barbieri R, Majzoub JA. Corticotrophin releasing hormone levels in human plasma and amniotic fluid during gestation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994, 40: 257–266.
30. Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O, Quinn JP. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cell Mol Neurobiol* 1996, 16: 325–344.

31. Germain AM, Kato S, Carvajal JA, Valenzuela GJ, Valdes GL, Glasinovic JC. Bile acids increase response and expression of human myometrial oxytocin receptor. *Am J Obstet Gynecol* 2003, 189: 577–82.
32. Gilbert Evans SE, Ross LE, Sellers EM, Purdy RH, Romach MK: 3 α -reduced neuroactive steroids and their precursors during pregnancy and the postpartum period. *Gynecol Endocrinol* 2005, 21: 268–279.
33. Godfroid IO, Charlot A. Postpartum psychiatry. *Rev Med Brux* 1996, 17: 22–23.
34. Goland RS, Jozak S, Warren WB, Conwell IM, Stark RI, Tropper PJ. Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77: 1174–1179.
35. Grammatopoulos DK, Hillhouse EW: Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet* 1999, 354: 1546–1549.
36. Gregoire AJ, Kumar R, Everitt B, Henderson AF, Studd JW. Transdermal estrogen for treatment of severe postnatal depression. *Lancet* 1996, 347: 930–933.
37. Havlikova H, Hill M, Kancheva L, Vrbikova J, Pouzar V, Cerny I, Kancheva R, Starka L: Serum profiles of free and conjugated neuroactive pregnanolone isomers in nonpregnant women of fertile age. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 3092–3099.
38. Harris B, Lovett L, Newcombe RG, Read GF, Walker R, Riad-Fahmy D. Maternity blues and major endocrine changes: Cardiff puerperal mood and hormone study II. *BMJ* 1994, 308: 949–953.
39. Harrison NL, Simmonds MA. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 1984, 323: 287–92.
40. Hertz JB, Larsen JF, Arends J, Nielsen J. Progesterone and human chorionic gonadotrophin in serum and pregnandiol in urine in threatened abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1980, 59: 23–27.
41. Hill M, Paskova A, Kancheva R, Velikova M, Kubatova J, Kanchewa L, Adamcova K, Mikesova M, Zizka Z, Koucky M, Sarapatkova H, Kacer V, Matucha P, Meloun M, Parizek A.

Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2013, in press.

42. Hill M, Parizek A, Cibula D, Kancheva R, Jirasek JE, Jirkovska M, Veliková M, Kubatova J, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Kancheva L, Kazihnitzkova H, Zamrazilova L, Starka L. Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010a, 122(4): 114–32.
43. Hill M, Parizek A, Kancheva R, Duskova M, Velikova M, Kriz L, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Matucha P, Meloun M, Starka L. Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010b, 121(3–5): 594–610.
44. Hill M, Bicikova M, Parizek A, Havlikova H, Klak J, Fajt T, Meloun M, Cibula D, Cegan A, Sulcova J, Hampl R, Starka L. Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal blood: 2. Time profiles of pregnanolone isomers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001, 78: 51–57.
45. Hill M, Cibula D, Havlikova H, Kancheva L, Fajt T, Kancheva R, Parizek A, Starka L. Circulating levels of pregnanolone isomers during the third trimester of human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, 105: 166–175.
46. Hill M, Parizek A, Bicikova M, Havlikova H, Klak J, Fajt T, Cibula D, Hampl R, Cegan A, Sulcova J, Starka L. Neuroactive steroids, their precursors, and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 1. Identification and simultaneous determination of pregnanolone isomers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, 75: 237–244.
47. Hill M, Parizek A, Jirasek JE, Jirkovska M, Velikova M, Duskova M, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Germanova A, Koucky M, Kalouskova M, Starka L. Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res* 2010c, 59: 211–224.
48. Hill M, Parizek A, Kancheva R, Jirasek JE. Reduced progesterone metabolites in human late pregnancy. *Physiol Res* 2011a, 60: 225–241.
49. Hill M, Parizek A, Velikova M, Kubatova J, Kancheva R, Duskova M, Simunkova K, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Jirasek JE, Jirkovska M, Starka L. The distribution of placental

- oxidoreductase isoforms provides different milieus of steroids influencing pregnancy in the maternal and fetal compartment. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2011b, 4: 581–600.
50. Chang J, Zhang Y, Cui L. Impact of placental hormone withdrawal on postpartum depression. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1995, 30: 342–344.
 51. Ishida T, Seo F, Hirato K, Fukuda T, Yanaihara T, Araki H, Nakayama T. Changes in placental enzymatic activities in relation to estrogen production during pregnancy. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1985, 37: 547–54.
 52. Jaffe RB, Mesiano S, Smith R, Coulter CL, Spencer SJ, Chakravorty A. The regulation and role of fetal adrenal development in human pregnancy. *Endocr Res* 1998, 24: 919–926.
 53. Jayasekara WS, Yonzawa T, Ishida M, Yymynouchi K, Nishihara M. Expression and possible role of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the placenta of the goat. *J Reprod Dev* 2005, 51: 265–272.
 54. Jin Y, Penning TM. Steroid 5 α -reductases and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001, 15: 79–94.
 55. Kaura V, Ingram CD, Gartside SE, Zouny AH, Judge S.J. The progesterone metabolite allopregnanolone potentiates GABA(A) receptor-mediated inhibition of 5-HT neuronal activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007, 17: 108–115.
 56. Kemp B, Bongartz K, Rath W. Psychic disturbances in the postpartum period: an increasing problem? *Z Geburtshilfe Neonatol* 2003, 207: 159–165.
 57. Keresztes P, Ayers JW, Menon KM, Romani T. Comparison of peripheral, uterine and cord estrogen and progesterone levels in laboring and nonlaboring women at term. *J Reprod Med* 1988, 33: 691–694.
 58. Klak J, Hill M, Parizek A, Havlikova H, Bicikova M, Hampl R, Fait T, Sulcova J, Pouzar V, Kancheva R, Starka L. Pregnanolone isomers, pregnenolone and their polar conjugates around parturition. *Physiol Res* 2003, 52: 211–221.

59. Koksma JJ, van Kesteren RE, Rosahl TW, Zwart R, Smit AB, Lüddens H, Brussaard AB. Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic nucleus around parturition. *J Neurosci* 2003, 23: 788–97.
60. Lahav M, Lamprecht SA, Amsterdam A, Lindner HR. Suppression of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat luteal cells by prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 1977, 6: 293–302.
61. Lamprecht SA, Lindner HR, Strauss JF, 3rd: Induction of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat corpora lutea by pharmacological blockade of pituitary prolactin secretion. *Biochim Biophys Acta* 1969, 187: 133–143.
62. Lanczik M, Brockington IF. Postpartum dysphoric syndrome. Psychopathology, diagnosis and etiology. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1999;67: 60-67.
63. Laatikainen T, Lehtonen P, Hesso A. Biliary bile acids in uncomplicated pregnancy and in cholestasis of pregnancy. *Clin Chim Acta* 1978, 85: 145–50.
64. Le Goascogne C., Robel P., Gouezou M., Sananes N., Baulieu E.E., Waterman M., Neurosteroids: cytochrome P-450sc in rat brain. *Science* 1987, 237: 1212–5.
65. Leng G, Russell JA. Coming to term with GABA. *J Physiol (Lond)* 1999, 516 (Pt 2): VI.
66. Leslie KK, Zuckerman DJ, Schruffer J, Burchell M, Smith J, Albertson BD. Oestrogen modulation with parturition in the human placenta. *Placenta* 1994, 15: 79–88.
67. Leslie KK, Reznikov L, Simon FR, Fennessey PV, Reyes H, Ribalta J. Estrogens in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol* 2000, 95: 372–6.
68. Leuenberger N, Pradervand S, Wahli W. Sumoylated PPARalpha mediates sex-specific gene repression and protects the liver from estrogen-induced toxicity in mice. *J Clin Invest* 2009. 119: 3138–48.
69. Lofgren M, Holst J, Backstrom T. Effects in vitro of progesterone and two 5 alpha-reduced progestins, 5 alpha-pregnane-3,20-dione and 5 alpha-pregnane-3 alpha-ol-20-one, on contracting human myometrium at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992, 71: 28–33.
70. Luisi S, Petraglia F, Benedetto C, Nappi RE, Bernadi F, Fadalti M, Reis FM, Luisi M, Genazzani AR. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during

- pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 2429–2433.
71. Lundgren P, Stromberg J, Backstrom T, Wang M. Allopregnanolone-stimulated GABA-mediated chloride ion flux is inhibited by 3beta-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one (isoallopregnanolone). *Brain Res* 2003, 982: 45–53.
 72. Maayan R, Strous RD, Abou-Kaoud M, Weizman A. The effect of 17beta estradiol withdrawal on the level of brain and peripheral neurosteroids in ovariectomized rats. *Neurosci Lett* 2005, 384: 156–161.
 73. Macias RI, Pascual MJ, Bravo A, Alcalde MP, Larena MG, St-Pierre MV, Serrano MA, Marin JJ. Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* 2000, 31: 975–83.
 74. Madsen G, Zakar T, Ku CY, Sanborn BM, Smith R, Mesiano S. Prostaglandins differentially modulate progesterone receptor-A and -B expression in human myometrial cells: evidence for prostaglandin-induced functional progesterone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 1010–1013.
 75. Mahesh VB, Brann DW, Hendry LB. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996, 56: 209–219.
 76. Maitra R, Reynolds JN. Modulation of GABA(A) receptor function by neuroactive steroids: evidence for heterogeneity of steroid sensitivity of recombinant GABA(A) receptor isoforms. *Can J Physiol Pharmacol* 1998, 76: 909–92.
 77. Majewska M.D., Bisslerbe J.C., Eskay R.L., Glucocorticoids are modulators of GABAA receptors in brain. *Brain Res* 1985, 339, 178–82.
 78. Majewska MD, Ford-Rice F, Falkay G. Pregnancy-induced alterations of GABAA receptor sensitivity in maternal brain: an antecedent of post-partum 'blues'? *Brain Res* 1989, 482: 397–401.
 79. Majewska MD, Vaupel DB. Steroid control of uterine motility via gamma-aminobutyric acidA receptors in the rabbit: a novel mechanism? *J Endocrinol* 1991, 131: 427–434.

80. Maguire J, Ferando I, Simonsen C, Mody I. Excitability changes related to GABAA receptor plasticity during pregnancy. *J Neurosci* 2009, 29: 9592–60.
81. Maruyama S, Suzuki T, Yanaihara T, Araki H, Nakayawa T. C21-steroid profiles in pregnancy associated with intrauterine growth retardation. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1986, 38: 513–9.
82. McLean M, Smith R. Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction* 2001, 121: 493–501.
83. Mellor DJ, Diesch TJ, Gunn AJ, Bennet L. The importance of 'awareness' for understanding fetal pain. *Brain Res Brain Res Rev* 2005, 49: 455–71.
84. Mesiano S. Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition. *J Soc Gynecol Investig* 2004, 11: 193–202.
85. Mickan H, Zander J. Pregnanolones, pregnenolone and progesterone in the human fetoplacental circulation at term of pregnancy. *J Steroid Biochem* 1979, 11: 1461–1466.
86. Mitchell BF, Mitchell JM, Chowdhury J, Tougas M, Engelen SM, Senff N, Heijnen I, Moore JT, Goodwin B, Wong S, Davidge ST. Metabolites of progesterone and the pregnane X receptor: a novel pathway regulating uterine contractility in pregnancy? *Am J Obstet Gynecol* 2005, 192, 1304–13, discussion 1313–5.
87. Moses-Kolko EL, Berga SL, Kalro B, Sit DK, Wisner KL. Transdermal estradiol for postpartum depression: a promising treatment option. *Clin Obstet Gynecol* 2009, 52:516–529.
88. Mostallino MC, Sanna E, Concas A, Biggio G, Follesa P. Plasticity and function of extrasynaptic GABA(A) receptors during pregnancy and after delivery. *Psychoneuroendocrinology* 2009, 34 Suppl 1: S74–83.
89. Mitchell BF, Wong S. Changes in 17 beta,20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity supporting an increase in the estrogen/progesterone ratio of human fetal membranes at parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1993, 168: 1377–1385.
90. Nappi RE, Petraglia F, Luisi S, Polatti F, Farina C, Genazzani AR. Serum allopregnanolone in women with postpartum "blues". *Obstet Gynecol* 2001, 97: 77–80.

91. Neuman M, Beller U, Boldes R, Kohelet D, Hertzeanu I, Goldberg M. Onset of spontaneous labor and changes in E2 and progesterone levels--possible interrelation. *J Perinat Med* 1992, 20: 429–435.
92. Ni X, Hou Y, King BR, Tang X, Read MA, Smith R, Nicholson RC. Estrogen receptor-mediated down-regulation of corticotropin-releasing hormone gene expression is dependent on a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulatory element in human placental syncytiotrophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 a, 89: 2312–2318.
93. Ni X, Hou Y, Yang R, Tang X, Smith R, Nicholson RC. Progesterone receptors A and B differentially modulate corticotropin-releasing hormone gene expression through a cAMP regulatory element. *Cell Mol Life Sci* 2004 b, 61: 1114–1122.
94. Nishizawa M, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H, Sasaguri Y, Watanabe K, Ito S. Close kinship of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene with three aldo-keto reductase genes. *Genes Cells* 2000, 5: 111–125.
95. Nodwell A, Carmichael L, Fraser M, Challis J, Richardson B. Placental release of corticotrophin-releasing hormone across the umbilical circulation of the human newborn. *Placenta* 1999, 20: 197–202.
96. O'Leary P, Boyne P, Flett P, Beilby J, James I. Longitudinal assessment of changes in reproductive hormones during normal pregnancy. *Clin Chem* 1991, 37: 667–672.
97. Ong J, Kerr DI. GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sci*. 1990, 46: 1489–1501.
98. Oren I, Fleishman SJ, Kessel A, Ben-Tal N. Free diffusion of steroid hormones across biomembranes: a simplex search with implicit solvent model calculations. *Biophys J* 2004, 87: 768–779.
99. Othman YS, Oakey RE. Why so much oestriol? A comparison of the aromatisation of androstenedione and 16 alpha-hydroxyandrostenedione when incubated alone or together with human placental microsomes. *J Endocrinol* 1996. 148: 399–407.
100. Pacifici GM. Sulfation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev*, 2005. 81: 573–81.

101. Parizek A, Hill M, Kancheva R, Havlikova H, Kancheva L, Cindr J, Paskova A, Pouzar V, Cerny, Drbohlav P, Hajek Z, Starka L. Neuroactive pregnanolone isomers during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90: 395–403.
102. Park-Chung M, Malayev A, Purdy RH, Gibbs TT, Farb DH. Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res* 1999, 830: 72–87.
103. Park-Chung M, Wu FS, Farb DH. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol* 1994, 46: 146–150.
104. Pasanen M, Helin-Martikainen HL, Pelkonen O, Kirkinen P. Intrahepatic cholestasis of pregnancy impairs the activities of human placental xenobiotic and steroid metabolizing enzymes in vitro. *Placenta* 1997; 18: 37–41.
105. Pearson Murphy BE, Allison CM. Determination of progesterone and some of its neuroactive ring A-reduced metabolites in human serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, 74: 137–142.
106. Pearson Murphy BE, Steinberg SI, Hu FY, Allison CM. Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: elevated levels of 5 alpha-dihydroprogesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86: 5981–5987.
107. Perez MJ, Castaño B, Jimenez S, Serrano MA, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. Role of vitamin C transporters and biliverdin reductase in the dual pro-oxidant and anti-oxidant effect of biliary compounds on the placental-fetal unit in cholestasis during pregnancy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008. 232: 327–36.
108. Pierkorz RP, Gingras S, Hoffmeyer A, Ihle JN, Weinstein Y. Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and activator of transcription 5 and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* 2005, 19: 431–440.
109. Putnam CD, Brann DW, Kolbeck RC, Mahesh VB. Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: mediation by progesterone and gamma amino butyric acidA receptor systems. *Biol Reprod* 1991, 45: 266–272.

110. Reyes H. Sex hormones and bile acids in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology* 2008, 47: 376–9.
111. Ro JY. Contribution of peripheral NMDA receptors in craniofacial muscle nociception and edema formation. *Brain Res* 2003, 979: 78–84.
112. Rouge-Pont F, Mayo W, Marinelli M, Gingras M, Le Moal M, Piazza PV. The neurosteroid allopregnanolone increases dopamine release and dopaminergic response to morphine in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 2002, 16: 169–173.
113. Rupprecht R, Berning B, Hauser CA, Holsboer F, Reul JM. Steroid receptor-mediated effects of neuroactive steroids: characterization of structure-activity relationship. *Eur J Pharmacol* 1996, 303: 227–234.
114. Savander M, Ropponen A, Avela K, Weerasekera N, Cormand B, Hirvioja ML, Riikonen S, Ylikorkala O, Lehesjoki AE, Williamson C, Aittomäki K. Genetic evidence of heterogeneity in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* 2003, 52: 1025–9.
115. Sentilhes L, Verspyck E, Pia P, Marpeau L. Fetal death in a patient with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2006, 107: 458–60.
116. Sheehan PM, Rice GE, Moses EK, Brennecke SP. 5 Beta-dihydroprogesterone and steroid 5 beta-reductase decrease in association with human parturition at term. *Mol Hum Reprod* 2005, 11: 495–501.
117. Schreiber V, Neuropeptides and neurosteroids (author's transl). *Cas Lek Cesk* 1980, 119: 656–9.
118. Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJ, Garcia-Segura LM, Lambert JJ, Mayo W, Melcangi RC, Parducz A, Suter U, Carelli C, Baulieu EE, Akwa Y. Steroids hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2003, 71: 3–29.
119. Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert TF, Labombarda F, Desarnaud F, Robel P, De Nicola AF, Baulieu EE. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol* 2000, 29: 307–26.
120. Sirianni R, Mayhew BA, Carr BR, Parker CR, jr., Rainey WE. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and urocortin act through type 1 CRH receptors to stimulate

- dehydroepiandrosterone sulfate production in human fetal adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, 90: 5393–5400.
121. Smith AJ, Alder L, Silk J, Adkins C, Fletcher AE, Scales T, Kerby J, Marshall G, Wafford KA, McKernan RM, Attack JR. Effect of alpha subunit on allosteric modulation of ion channel function in stably expressed human recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors determined using (36)Cl ion flux. *Mol Pharmacol* 2007, 59: 1108–1118.
 122. Smith R. Parturition. *N Engl J Med* 2007, 356: 271–283.
 123. Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 2916–2920.
 124. Smith JL, Lear SR, Forte TM, Ko W, Massimi M, Erickson SK. Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res* 1998, 39: 2237–49.
 125. Stoffel-Wagner B. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 1007: 64–78.
 126. Stocco CO, Chedrese J, Deis RP. Luteal expression of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase genes in late pregnant rats: effect of luteinizing hormone and RU486. *Biol Reprod* 2001, 65: 1114–1119.
 127. Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF, Gibori G: Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 2000, 275: 37202–37211.
 128. Sugino N, Telleria CM, Gibori G. Progesterone inhibits 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor. *Endocrinology*. 1997, 138: 4497–4500.
 129. Taylor MJ. Concentrations of progesterone and oestradiol-17 beta after administration of a 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor to sheep in late pregnancy. *J Endocrinol*. 1987, 113: 97–101.

130. Todorovic SM, Pathirathna S, Brimelow BC, Jagodic MM, Ko SH, Jiang X, Nilsson KR, Zorumski CF, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V. 5 β -reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca²⁺ channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. *Mol Pharmacol* 2004, 66: 1223–1235.
131. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics, *J Proteome Res* 2007, 6(2): 469–479.
132. Turkmen S, Lofgren M, Birzniece V, Backstrom T, Johansson IM: Tolerance development to Morris water maze test impairments induced by acute allopregnanolone. *Neuroscience* 2006, 139: 651–9.
133. Veomett MJ, Daniel JC, jr. Termination of pregnancy after accelerated lactation in the rat. IV. Relationship to 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity and plasma progesterone concentration. *J Reprod Fertil* 1975, 44: 529–536.
134. Vu TT, Hirst JJ, Stark M, Wright IM, Palliser HK, Hodyl N, Clifton VL. Changes in human placental 5 α -reductase isoenzyme expression with advancing gestation: effects of fetal sex and glucocorticoid exposure. *Reprod Fertil Dev* 2009, 21: 599–607.
135. Wadhwa PD, Porto M, Garite TJ, Chicx-Demet A, Sandman CA. Maternal corticotropin-releasing hormone levels in the early third trimester predict length of gestation in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998, 179: 1079–1085.
136. Wang MD, Wahlstrom G, Backstrom T. The regional brain distribution of the neurosteroids pregnenolone and pregnenolone sulfate following intravenous infusion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997, 62: 299–306.
137. Warren WB, Patrick SL, Goland RS. Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1992, 166: 1198–1204; discussion 1204–1197.
138. Weaver CE, jr., Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 10450–10454.
139. Wolfe C, Poston L, Jones M. Digoxin-like immunoreactive factor, corticotropin-releasing factor, and pregnancy. *Lancet* 1987, 1: 335–336.

140. Yawno T, Hirst JJ, Castillo-Melendez M, Walker DW. Role of neurosteroids in regulating cell death and proliferation in the late gestation fetal brain. *Neuroscience* 2009. 163: 838–47.
141. Zhu D, Wang MD, Backstrom T, Wahlstrom G. Evaluation and comparison of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of allopregnanolone and pregnanolone at induction of anaesthesia in the male rat. *Br J Anaesth* 2001, 86: 403–412.
142. Zhu P, Tao FB, Jiang XM, Hao JH, Wang YL, Xu YY. Effect of intrahepatic cholestasis of pregnancy on the functions of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis and adrenal cortex in normal neonates. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2010 Jan, 12(1): 5–8.

XI. SEZNAM VLASTNÍCH PRACÍ

a) impaktované se vztahem k tématu

- The role of steroids in the development of post-partum mental disorders. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 2012 (IF 0,702). Paskova A, Jirak R, Mikesova M, Adamcova K, Fartakova Z, Horakova V, Koucky M, Hill M, Hruskovicova H, Starka L, Duskova M, Parizek A.
- Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus. J Steroid Biochem Mol Biol. 2013 (IF 3.053). Hill M, Pašková A, Kančeva R, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, Adamcová K, Mikešová M, Zizka Z, Koucký M, Sarapatková H, Kačer V, Matucha P, Meloun M, Pařízek A.
- Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 (IF 2.886). Hill M, Parizek A, Cibula D, Kancheva R, Jirasek JE, Jirkovska M, Velikova M, Kubatova J, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Kancheva L, Kazihnitkova H, Zamrazilova L, Starka L.
- Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 (IF 2.886). Hill M, Parizek A, Kancheva R, Duskova M, Velikova M, Kriz L, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Matucha P, Meloun M, Starka L.
- Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? Physiol Res. 2010 (IF 1,65). Hill M, Parizek A, Jirasek JE, Jirkovska M, Velikova M, Duskova M, Klimková M, Paskova A, Zizka Z, Germanova A, Koucky M, Kalousova M, Starka L.
- Neuroactive pregnanolone isomers during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 2005 (IF 6,02). Parizek A, Hill M, Kancheva R, Havlikova H, Kancheva L, Cindr J, Paskova A, Pouzar V, Cerny I, Drbohlav P, Hajek Z, Starka L.

b) neimpaktované se vztahem k tématu

- Progesterone neuroactive metabolites in human pregnancy. Ceska Gynekol. 2010. Klímková M, Parizek A, Velíková M, Hill M, Paskova A, Zizka Z, Kancheva R, Kalousová M, Koucký M, Germanova A, Hajek Z, Starka L.

c) neimpaktované bez vztahu k tématu

- Intrapartal fetal monitoring, sensitivity and specificity of methods. Ceska Gynekol. 2006. Hajek Z, Srp B, Pavlikova M, Zvarova J, Liska K, El-Haddad R, Paskova A, Parizek A.
- Analysis of present diagnostic methods of intrapartum fetal hypoxia. Ceska Gynekol. 2005. Hajek Z, Srp B, Haddad el R, Drbohlav P, Parizek A, Liska K, Paskova A, Zvarova J, Simeckova A.

d) abstrakta se vztahem k tématu

posterová sdělení spoluautor:

- Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2009 Placenta: the Key to Pregnancy Success, Adelaide, Australia; Pařízek A, Pašková A, Hill M, Klimková M, Kalousová M, Stárka L.
- Steroid metabolome at labor. Society for Obstetric Anesthesia and Perinatology (SOAP) 41st Annual Meeting , Washington, USA; Pařízek A, Hill M, Dušková M, Velíková M, Kříž L, Klimková M, Pašková A, Žižka Z, Kalousová M, Matucha P, Meloun M, Stárka .
- Can steroids induce endogenous analgesia during labor? International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2010 Fetus and Placenta: A perfect harmony, Santiago, Chile; Pařízek A, Hill M, Klimková M, Kačer V, Koucký M, Hájek Z, Velíková M, Pašková A, Stárka L.
- The effects of neuroactive progesterone metabolites in the fetal CNS. Society for Obstetric Anesthesia and Perinatology (SOAP) 43rd Annual Meeting Program Theme: "Providing Safe Outcomes for Mother and Baby" 2011 Nevada, USA; Pařízek A, Hill M, Klimková, Pašková A, Kačer V, Koucký M.

XI. PŘÍLOHY

Vybrané publikované práce ve vztahu k tématu:

- The role of steroids in the development of post-partum mental disorders. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 2012 (IF 0,702). Paskova A, Jirak R, Mikesova M, Adamcova K, Fartakova Z, Horakova V, Koucky M, Hill M, Hruskovicova H, Starka L, Duskova M, Parizek A.
- Neuroactive pregnanolone isomers during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 2005 (IF 6,02). Parizek A, Hill M, Kancheva R, Havlikova H, Kancheva L, Cindr J, Paskova A, Pouzar V, Cerny I, Drbohlav P, Hajek Z, Starka L.
- Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 (IF 2.886). Hill M, Parizek A, Kancheva R, Duskova M, Velikova M, Kriz L, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Matucha P, Meloun M, Starka L.

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta

Kateřinská 32, Praha 2

Prohlášení zájemce o nahlédnutí

do závěrečné práce absolventa studijního programu

uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis